



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CLINICHE E FARMACOTOSSICOLOGICHE
VETERINARIE**

TESI

**“DETERMINAZIONE DELLA QUANTITA' DEL DNA E
DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DELLE CITOCHINE
NEI CANI ASINTOMATICI NATURALMENTE INFETTI
DA *LEISHMANIA INFANTUM*”**

**COORDINATORE
PROF. A. PERSECHINO**

**CANDIDATA
DOTT.SSA ELISABETTA VIOLA**

ANNO 2007



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CLINICHE E FARMACOTOSSICOLOGICHE
VETERINARIE**

TESI

**“DETERMINAZIONE DELLA QUANTITA' DEL DNA E
DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DELLE CITOCINE
NEI CANI ASINTOMATICI NATURALMENTE INFETTI
DA *LEISHMANIA INFANTUM*”**

RELATORI

PROF. A.E. GRAVINO

PROF. G. OLIVA

CANDIDATA

DOTT.SSA ELISABETTA VIOLA

ANNO 2007



**A Rita e Mike,
senza di loro non sarei andata molto lontano.**

A Sara



INDICE

1. INTRODUZIONE	6
1.1 EZIOLOGIA	10
1.1.1 CLASSIFICAZIONE	10
1.1.2 CICLO BIOLOGICO	12
1.1.3 MORFOLOGIA	13
1.1.4 METACICLOGENESI	15
1.2 IL VETTORE	15
1.2.1 MORFOLOGIA	18
1.2.2 CAPACITÀ DI TRASMISSIONE	20
1.3 IL SERBATOIO	21
1.4 LA MALATTIA NELL'UOMO	23
2. CICLO BIOLOGICO E PATOGENESI	29
3. SINTOMATOLOGIA	36
4. DIAGNOSI	45
4.1 ESAMI DI LABORATORIO ASPECIFICI	46
4.1.1 Proteine totali ed elettroforesi del siero	46
4.1.2 Esame emocromocitometrico	48
4.1.3 Velocità di eritro-sedimentazione (VES)	48
4.1.4 Enzimi epatospecifici	48
4.1.5 Urea e creatinina	49
4.1.6 Esame delle urine	49
4.2 ESAMI DI LABORATORIO SPECIFICI	50
4.2.1 METODI DIRETTI	50
4.2.1.1 Esami parassitologici	50
4.2.2 METODI INDIRETTI	52
4.2.2.1 Esami sierologici	52
4.2.2.2 Diagnostica molecolare	56
4.2.2.3 Real-Time PCR	57



5. TERAPIA	59
5.1 COMPOSTI ANTIMONIALI	60
5.2 ALLOPURINOLO	64
5.3 AMINOSIDINA	65
5.4 AMFOTERICINA B	66
5.5 MILTEFOSINE	68
5.6 METRONIDAZOLO	69
5.7 ENROFLOXACINA	70
5.8 PENTAMIDINA	71
5.9 IMMUNOMODULATORI	72
6. PROFILASSI	74
7. OBIETTIVI DEL LAVORO	79
8. MATERIALI E METODI	83
8.1 Animali	83
8.2 Campioni biologici	84
8.3 Colture parassitarie	84
8.4 Estrazione del DNA	84
8.5 Estrazione dell'RNA e produzione di cDNA	85
8.6 Sintesi dei primers e delle sonde	85
8.7 Real-time PCR	87
9. RISULTATI	89
10. DISCUSSIONE	95
11. CONCLUSIONI	100
12. BIBLIOGRAFIA	101



1. INTRODUZIONE

Le leishmaniosi sono infezioni protozoarie ad ampia distribuzione tropicale, subtropicale e mediterranea, diffuse nel Vecchio e nel Nuovo Mondo tranne che in Australia, in Oceania ed in Antartide. In tutto il mondo, le leishmaniosi appaiono in costante aumento, soprattutto nei paesi economicamente sviluppati, con 1-2 milioni di casi nuovi/anno, dei quali circa 600.000 in forma viscerale ed i restanti a localizzazione cutanea (WHO, 2001). Di questa quota circa il 25% è rappresentato da forme viscerali localizzate, presenti maggiormente nel Sub-continente indiano, in Sudan ed in Brasile. Le forme cutanee sono più numerose nel Medio Oriente (Afghanistan, Arabia, Siria, Iran) e nelle Americhe (tranne in Canada, in Cile ed in Uruguay). Nel "Vecchio Mondo", cioè Eurasia e Africa, le leishmaniosi si trovano in ambienti rurali, di macchia mediterranea (bacino del Mediterraneo), nelle zone semidesertiche (Medio oriente, Asia Centrale, Sahel), e nelle valli dei grandi fiumi asiatici (Fiume Giallo, Yang Tze-Kiang, Gange, Brahmaputra) (Figura 1).

La popolazione mondiale a rischio raggiunge i 368 milioni di persone.

In Italia l'infezione è endemica lungo tutte le coste dell'Italia peninsulare e nelle isole, con una prevalenza che raggiunge il 48.8% (Paradies *et al.*, 2006); sempre più di frequente viene diagnosticata in aree sinora ritenute indenni, sia in animali che hanno soggiornato in zone a rischio (Rivò *et al.*, 2000). In Figura 2 sono indicati il numero di casi di leishmaniosi viscerale umana registrati in Italia dal 1998 al 2004.

Questa parassitosi colpisce sia gli animali che l'uomo, dove l'uomo svolge generalmente il ruolo di ospite occasionale per il ciclo vitale del parassita.

L'agente causale è rappresentato da un protozoo appartenente al genere *Leishmania*, il cui nome deriva da Leishman, un patologo londinese che, per primo, agli inizi del 900, descrisse queste forme parassitarie nell'uomo. Questo protozoo è ospite intracellulare obbligato del sistema reticolo-istocitario dell'uomo e di altri mammiferi con un ciclo vitale che coinvolge due ospiti, uno vertebrato che svolge il ruolo di serbatoio della malattia, e l'altro invertebrato con il compito di vettore.



Figura 1. Distribuzione della leishmaniosi nel Nuovo Mondo.

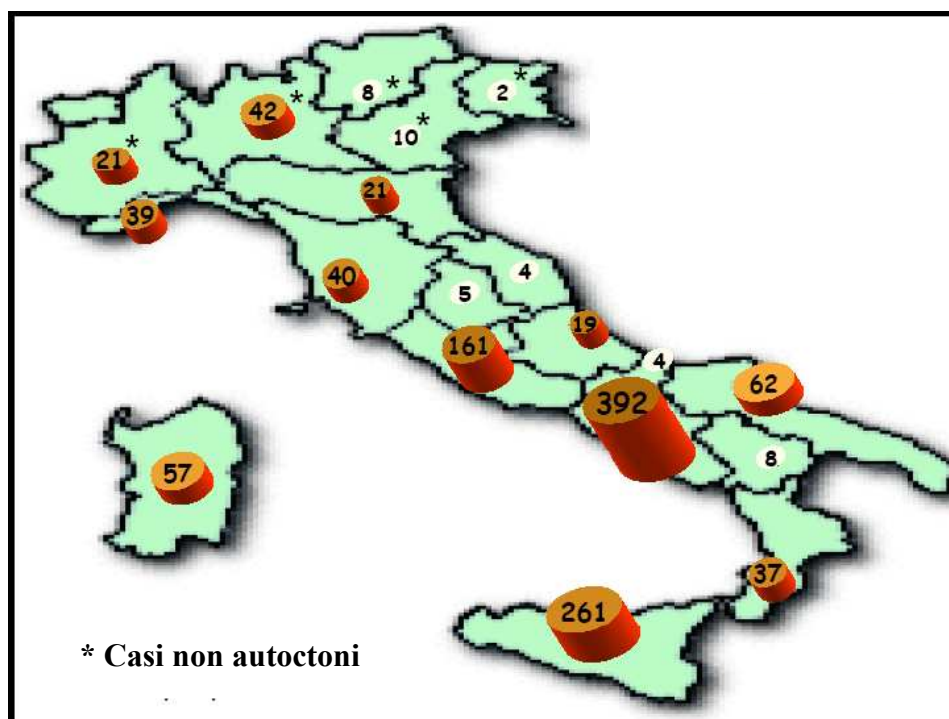


Figura 2. Incidenza della VL umana nel periodo compreso tra il 1998 ed il 2004 (1196 casi totali).



Nelle forme antroponotiche (non presenti in Italia), l'unico ospite recettivo è l'uomo, per cui l'insetto trasmette il parassita da un uomo all'altro; nelle forme zoonotiche, il serbatoio naturale è un animale, da cui il flebotomo assume il parassita per trasmetterlo ad altri animali o all'uomo.

L'unica specie di *Leishmania* presente in Italia è la *Leishmania infantum* (conosciuta anche come *L. chagasi* in Sud America), responsabile sia della forma viscerale zoonotica (LVZ) che di quella cutanea (LC). In questo caso, il serbatoio naturale più importante del parassita è il cane domestico: il flebotomo punge un cane infetto e assume il parassita che trasmette ad altri cani o all'uomo, infettandoli. Il ciclo di *L. infantum* può essere descritto come formato da tre anelli (flebotomo, cane, uomo) strettamente connessi tra di loro (Figura 3). Va specificato comunque che i flebotomi, oltre all'uomo e al cane pungono e succhiano sangue anche da altri animali.

La via naturale di contagio è rappresentata dall'inoculazione dei promastigoti metaciclici infettanti nella cute (sito primario d'infezione) dei mammiferi ospiti. Studi recenti hanno dimostrato la trasmissione sperimentale di *L. infantum* mediante trasfusione di sangue intero (Owens *et al.*, 2001; de Freitas *et al.*, 2006). Nell'uomo è stata ipotizzata anche una trasmissione congenita della leishmaniosi viscerale (Figueiró-Filho *et al.*, 2004), mentre nel cane i pochi studi al riguardo forniscono risultati alquanto controversi (Andrade *et al.*, 2002; Rosypal *et al.*, 2005a).

Sono colpiti animali di tutte le razze ed età, sebbene dai molti studi condotti sembra esserci una predisposizione nei cani di grossa taglia, e tra questi nei cani da caccia, probabilmente per il lungo periodo di tempo che trascorrono all'aria aperta, e nei soggetti al di sopra dei nove mesi di età, per il lungo periodo di incubazione di questa malattia (Denerolle, 1996; Koutinas *et al.*, 1999).

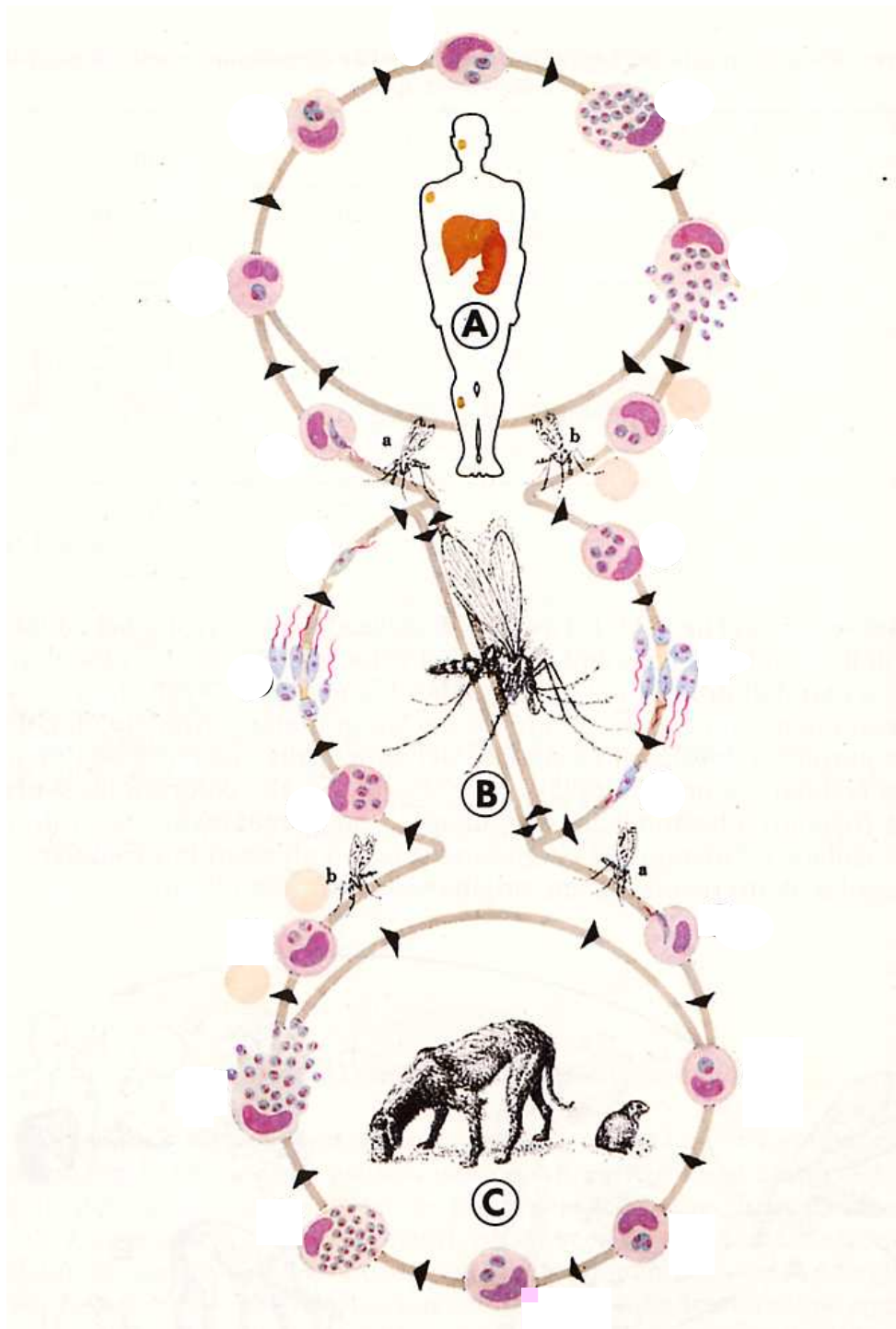


Figura 3. Ciclo biologico di *Leishmania infantum*.



1.1 EZIOLOGIA

1.1.1 CLASSIFICAZIONE

I protozoi del genere *Leishmania* sono parassiti intracellulari obbligati dei macrofagi e delle cellule dendritiche (cellule del sistema reticolo-istiocitario) del cane, dell'uomo e di numerosi animali selvatici. Raramente sono stati riscontrati nel bovino e nel cavallo. Essi appartengono al genere *Leishmania*, ordine *Kinetoplastida*, phylum *Sarcomastigophora*, famiglia *Trypanosomatidae*. Il genere *Leishmania* è a sua volta suddiviso in due sottogeneri, *Leishmania (Leishmania)* parassiti del Vecchio e Nuovo Mondo, e *Leishmania (Viannia)*, parassiti del Nuovo Mondo, nei quali troviamo classificate diverse specie. In [Tabella 1](#) sono indicate le specie di *Leishmania* che rivestono maggiore importanza dal punto di vista medico.

Sottogenere	Leishmania
Specie	L. donovani
	L. infantum
	L. major L. tropica (Vecchio Mondo)
	L. amazonensis
	L. mexicana
	L. pifanoi
	L. venezuelensis (Nuovo Mondo)
Sottogenere	Viannia Specie
	L. braziliensis
	L. chagasi
	L. guyanensis
	L. panamensis
	L. peruviana

Tabella 1. Principali specie di *Leishmania* incluse nei due sottogeneri *Leishmania Leishmania* e *Leishmania Viannia*.



Le varie specie di *Leishmania* non sono distinguibili morfologicamente e causano lesioni che evolvono in forma differente, per cui la tassonomia riveste una notevole importanza medica. Molte delle specie conosciute di *Leishmania* vengono differenziate sulla base della loro distribuzione geografica, della peculiarità d'organotropismo e dell'azione patogena nei confronti delle specie animali loro ospiti, ed in virtù delle loro caratteristiche morfologiche, culturali, biochimiche ed immunologiche. Mediante l'utilizzo di tecniche biomolecolari, le diverse specie di *Leishmania* sono state ulteriormente classificate nei seguenti raggruppamenti (complex),:

Complesso *L. donovani*: *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*

Complesso *L. mexicana*: *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensi*

Complesso *L. tropica*

Complesso *L. major*

Complesso *L. aethiopica*

La necessità di differenziare e caratterizzare le diverse popolazioni di parassiti al fine di stabilire meglio la diagnosi, il trattamento, la prognosi, e di valutare la possibile influenza che le variazioni interspecifiche possono svolgere sull'epidemiologia della patologia, ha favorito lo sviluppo di metodi di caratterizzazione estrinseci ed intrinseci.



I primi si riferiscono a caratteristiche fenotipiche del parassita, come la classificazione in base al soggetto infettato o al tipo di lesioni evocate. Le metodiche intrinseche sono invece più sensibili e specifiche in quanto analizzano il genoma del parassita. Tra le tecniche “fenotipiche” più utilizzate ricordiamo la caratterizzazione mediante isoenzimi e anticorpi monoclonali; tra i metodi “genotipici”, l’analisi dei frammenti di DNA, con o senza sonda, e l’amplificazione del genoma.

L’analisi immunoenzimatica ed elettroforetica ha permesso di stabilire che nel bacino del Mediterraneo, ed anche in Italia, il ceppo responsabile della leishmaniosi umana e canina, è rappresentato dalla *L. infantum*, ed in particolare dalle varianti enzimatiche (zimodemi) Montpellier 1 (MON 1) e Montpellier 72 (MON 72) (Gaskin *et al.*, 2002; de Freitas *et al.*, 2006). Quest’ultima variante è stata isolata soprattutto nell’area vesuviana.

1.1.2 CICLO BIOLOGICO

La *Leishmania* segue diverse tappe di sviluppo: nella sua forma di amastigote vive nel citoplasma delle cellule del sistema reticolo endoteliale (SRE) dei mammiferi; negli insetti vettori, invece, vive sotto forma di promastigote ancorata ai microvilli del tubo digerente grazie ad un lungo flagello. Il corpo misura circa 10 μ e possiede un kinetoplasto (DNA extranucleare) molto vicino al nucleo cellulare (*promastigote nectomona*) (Killick-Kendrick *et al.*, 1974).

Progredendo verso le porzioni anteriori dello stomaco del flebotomo, il corpo diviene più corto ed il flagello, ricco di lipofosfoglicani, si accorcia per facilitare l’adesione alle lectine che rivestono il tubo digerente. Il kinetoplasto è localizzato in posizione anteriore ed è privo di capacità infettante (*promastigote aptomona*) (Pimenta *et al.*, 1992).

Dopo circa dieci giorni dal suo ingresso nell’insetto vettore, il promastigote perde la sua aderenza, il flagello diviene molto lungo rispetto al corpo stretto e corto, si forma una borsa flagellare ripiena di vescicole e materiale di secrezione.



In questo stadio il parassita smette di replicarsi ma riacquista il suo potere infettante, e si localizza già libero nell'ipofaringe, pronto per essere inoculato (*promastigote metaciclico*) (Sacks and Perkins, 1984).

Quando il *promastigote* viene inoculato nel suo ospite vertebrato, il kinetoplasto si trova parallelo al nucleo, la borsa flagellare diviene molto profonda, il corpo assume una forma ovale ed il flagello inizia a ridurre il suo volume (*paramastigote*).

Il ciclo varia da 4 a 19 giorni; è inibito al di sotto dei 10 °C, ed è esaltato tra i 15 °C e i 20 °C.

1.1.3 MORFOLOGIA

Nei mammiferi infestati la *Leishmania* si presenta sotto forma di amastigote, con corpicciolo rotondo, globoso od ovalare, immobile, delle dimensioni di 2-5 μ di lunghezza per 2-3 μ di larghezza, fornito di un protoplasma granuloso omogeneo perifericamente delimitato da un plasmalemma tristratificato; di un grosso nucleo sferico centrale od eccentrico; di un kinetoplasto piriforme od a bastoncino, situato alla periferia del corpo parassitario ed in posizione antinucleare (spesso perpendicolare al nucleo). È presente il rizoplasto, abbozzo di flagello costituito da due microtubuli assiali

circondati da 9 paia di microtubuli periferici, che si diparte in prossimità del kinetoplasto da un corpo basale o blefaroplasto e si esaurisce, senza esteriorizzarsi, alla periferia della cellula protozoaria, circoscritto da un manicotto citoplasmatico rivestito dal plasmalemma, che si invagina profondamente in modo da costituire attorno al rizoplasto stesso una tasca flagellare aperta verso l'esterno. L'*amastigote* viene fagocitato dalle cellule macrofagiche e dendritiche del mammifero ospite ([Figura 4](#)).

Il promastigote morfologicamente si presenta come un elemento dal corpo stretto e lungo fino a 20 μ , con protoplasma granuloso, nucleo grande centrale, kinetoplasto bastoncellare (ubicato in posizione antinucleare subterminale o terminale) e blefaroplasto prossimo a questo, puntiforme. È munito di un lungo e robusto flagello che si diparte dal blefaroplasto e presto



si rende cranialmente libero, emergendo dalla tasca flagellare con porzione pressoché lunga quanto l'intero corpo (Figura 5).

Il paramastigote che è la forma virulenta che si rinviene nel faringe, piloro e nell'ileo dei flebotomi infestati si differenzia dai promastigoti perché è munito di kinetoplasto in genere ubicato non anteriormente ma allo stesso livello del nucleo, o poco posteriormente ad esso.

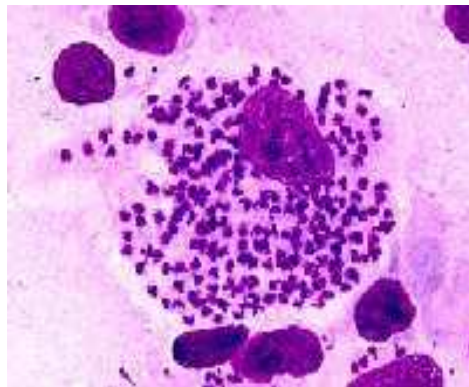


Figura 4. Forma Amastigote.

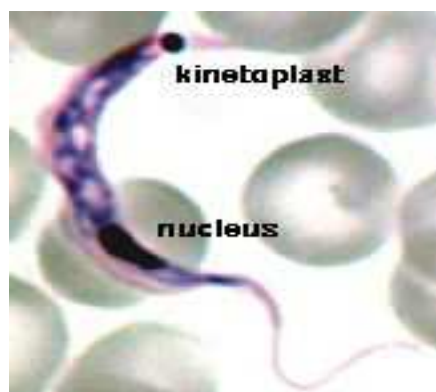


Figura 5. Forma Promastigote.



1.1.4 METACICLOGENESI

Dopo che il flebotomo ha ingerito sangue infetto da un ospite vertebrato contenente macrofagi parassitati, sono necessarie 24-36 ore affinché gli amastigoti siano liberati e si trasformino in promastigoti. Contemporaneamente, durante la prima ora successiva al pasto, l'insetto inizia a formare la membrana peritrofica con il fine di digerire il sangue. La membrana peritrofica possiede caratteristiche chimiche proprie per ciascuna specie di flebotomo, ciò spiega la specificità tra il tipo di flebotomo e la specie di *Leishmania* trasmessa.

Le molecole di superficie della *Leishmania* (gp63, LPG) sopportano l'azione litica degli enzimi che l'insetto produce per digerire il pasto di sangue (Davies *et al.*, 1990). Il promastigote, invece, riesce a digerire l'emoglobina grazie all'azione proteolitica della gp63 ed inoltre sintetizza enzimi chitino litici per liberarsi dalla membrana peritrofica, abbandonare lo stomaco del vettore, e localizzarsi nel punto più vantaggioso per la sua successiva trasmissione. Liberatosi dalla membrana peritrofica, il promastigote inserisce il suo flagello tra le microvillosità dell'intestino medio, toracico e del cardias del flebotomo, e grazie alla concentrazione di zuccheri dell'LPG a livello della punta del flagello, si unisce alla lectina del tubo digerente. La specificità tra il flebotomo e la *Leishmania* viene determinata dalla struttura dell'LPG (soprattutto dai residui di β -galattosio) e quindi dalla possibilità di aderire alle lectine. I promastigoti riescono in tal modo ad avanzare lungo il tubo digerente del flebotomo e, raggiunta la capacità infettante nell'arco di 10 giorni, si localizzano a livello di proventricolo e ipofaringe pronti ad essere inoculati al successivo pasto di sangue (Killick-Kendrick and Molyneux, 1981).

1.2 IL VETTORE

Le *Leishmanie* sono trasmesse dalla puntura di ditteri ematofagi (pappataci) dei generi *Phlebotomus* nel "Vecchio Mondo", e *Lutzomya* ("mosquito palha") e *Psychodopygus* (più raro) nelle Americhe.



Almeno una trentina di specie sono possibili vettori. Le specie italiane di flebotomi appartengono a due generi, *Phlebotomus* e *Sergentomyia*. Questo ultimo è rappresentato dalla sola specie *S. minuta* che punge animali a sangue freddo e non riveste quindi importanza sanitaria. Le altre specie del genere *Phlebotomus*, sono: *P. perniciosus*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus*, *P. sergenti*, *P. ariasi*, *P. mascitti*, *P. papatasi*, *P. major* (Bongiorno *et al.*, 2003).

Da studi effettuati sul territorio italiano da Maroli *et al.* (1994), il flebotomo più diffuso risulta essere il *P. perniciosus*, una specie antropofila e zoofila, che risulta presente in ambiente domestico (prevalenza 65,6%), ma che è reperibile anche in ambienti silvestri distanti dalle abitazioni (prevalenza 21,8%). Tale diffusione rende questo insetto una delle specie di flebotomi più interessanti dal punto di vista epidemiologico in quanto in grado di diffondere la *Leishmania* da un focolaio all'altro. In Italia questa specie è vettore provato della leishmaniosi viscerale umana e della leishmaniosi canina.

P. perfiliewi compare solo negli ambienti domestici ed è il vettore più probabile della leishmaniosi cutanea dell'uomo (Maroli *et al.*, 1987).

Questi due flebotomi sono abbondantemente diffusi in Campania, in particolare nelle zone ritenute endemiche per leishmaniosi, quali quelle del versante Vesuviano che si affaccia sul golfo di Napoli, nell'area Flegrea, nelle penisole Sorrentina ed Amalfitana, in gran parte delle province di Salerno e di Caserta, e nelle isole di Procida, Capri ed Ischia.

P. neglectus, sospettato di trasmettere la leishmaniosi viscerale e la leishmaniosi canina, veniva segnalato fino ad alcuni anni fa solo in aree limitate dell'Italia meridionale, ma recentemente è stato reperito anche in alcuni focolai del nord Italia (Capelli *et al.*, 2004).

P. major è considerato il vettore della leishmaniosi canina ed umana nelle zone garganiche.

L'habitat preferito dai flebotomi è quello secco, con vegetazione a macchia mediterranea, ricco di anfratti (zone tufacee), ad un altitudine di 100-300 m s.l.m., anche se i flebotomi possono adattarsi ad altitudini di poco superiori ai 1000 m. Le femmine ematofaghe di tali insetti pungono gli ospiti nelle ore



serali-notturne (20.00 – 06.00) nelle zone glabre della pelle, e si nutrono del sangue che esce dalla ferita. Nelle zone tropicali la trasmissione avviene tutto l'anno. Nelle regioni temperate la trasmissione avviene prevalentemente nel periodo compreso tra fine Maggio - inizi di Giugno, fino a metà Ottobre, con temperatura superiore ai 18 °C, in assenza di vento. Curiosamente, il volo dei flebotomi è del tutto silenzioso (di qui il nome di “pappatacio”), a differenza di quello delle comuni zanzare, con le quali, alcune volte, erroneamente, questi insetti vengono confusi nell’immaginario collettivo e dagli organi di stampa.

I pappataci vivono due mesi, quelli infettati di meno e hanno bisogno di molti pasti ematici (4-6) perché hanno la proboscide ostruita da una grande moltitudine di promastigoti di *Leishmania*, quindi pungono più spesso, con maggiore diffusione dell’infezione. Le femmine, una volta alimentatesi, tornano ai loro rifugi naturali per riposare e filtrare il sangue prima di localizzare il luogo adatto alla deposizione delle uova, che solitamente avviene 4-5 giorni dopo il pasto di sangue. I flebotomi subiscono una metamorfosi completa che include la fase di uova, quattro stadi larvali, uno di pupa e la forma adulta.

Le caratteristiche delle uova, 350 µm di lunghezza e 100 µm di larghezza con superficie squamata, rivestono interesse tassonomico. La deposizione delle uova è mediata da feromoni, ormoni che agiscono come attrattivi e stimolanti sessuali; essa avviene in luoghi sabbiosi, in penombra, con umidità relativamente alta, ricchi di materiale organico di cui si potranno alimentare le larve dopo la schiusa delle uova. Ogni deposizione prevede l’emissione di 50-100 uova dalle quali, dopo circa 4-6 giorni, si libera la larva di primo stadio. Si succedono quattro tappe di sviluppo larvale attraverso processi di muta consecutivi; verso la terza settimana si raggiunge la fase di pupa all’interno della quale si forma l’insetto adulto.

Il *P. perniciosus* solitamente presenta un ciclo stagionale bifasico, con un picco verso i primi quindici giorni di Luglio ed un altro, ancora più marcato, nel mese di Settembre, anche se nelle stagioni particolarmente umide i due picchi si possono fondere.

Una specie di flebotomo viene dichiarata vettore provato di una malattia solo



quando sono state verificate le seguenti condizioni:

- la sua distribuzione coincide con quella della malattia trasmessa
- è stata dimostrata la sua antropofilia e zoofilia
- è stata trovato infetto, in natura, con lo stesso parassita che causa la malattia nel uomo e nell'animale
- è stato provato sperimentalmente che è in grado di trasmettere il parassita.

1.2.1 MORFOLOGIA

I flebotomi sono piccoli insetti (2-3 mm), di colore giallo pallido o bruno con il corpo e le ali ricoperti da una fitta peluria (Figura 6). I maschi hanno segmenti genitali molto sviluppati. Torace e addome formano un angolo quasi retto con il corpo in entrambi i sessi (caratteristica che li rende riconoscibili anche ad occhio nudo). Il capo è rotondeggiante; gli occhi di colore scuro sono situati ai lati della testa e appaiono rotondeggianti se visti di profilo. Il capo ha due antenne composte da 16 articoli, di cui il primo è cilindrico, il secondo è rotondeggiante e fornito del sensillo di Johnston e gli altri articoli sono muniti di ascoidi, che secondo alcuni autori sono organi di senso. L'apparato boccale, pungente e succhiatore, è formato da: *labrum*-*epifaringe*, due mandibole, due mascelle, ipofaringe e *labium*. Ai lati delle mascelle sono presenti i palpi mascellari, composti da 5 articoli con il terzo recante le spine di Newstead, organi sensitivi con struttura caratteristica. Il torace è composto da tre segmenti. Il mesotorace, molto sviluppato, presenta un paio di ali ricoperte da una fitta peluria, mentre il metatorace presenta i due bilancieri. Inoltre, ogni segmento toracico porta un paio di zampe. L'addome è composto da 10 segmenti, di cui i terminali (3 nella femmina e 4 nel maschio) sono trasformati nell'apparato genitale. Nella femmina il nono urite si differenzia in una furca che circonda l'apertura genitale ed il decimo segmento è ridotto a due cerci fra i quali sbocca l'apertura anale. Nel maschio il settimo e ottavo urite sono invaginati l'uno nell'altro mentre il nono e il decimo segmento sono completamente modificati e costituiscono



l'armatura genitale. Quest'ultima è composta da tre appendici: la prima è formata da 2 articoli (coxite e stilo), la seconda ricca di setole, consta dei parameri che originano dalla base del coxite racchiudendo fra loro le due guaine dei filamenti del pene; la terza comprende i lobi laterali. Al margine dell'ano, lateralmente, sono localizzati i cerci, poco visibili perché coperti dalla base dei lobi laterali.



Figura 6. Femmina di *Phlebotomus* spp.



1.2.2 CAPACITÀ DI TRASMISSIONE

La maggior parte delle specie di flebotomi ha bisogno di ingurgitare sangue per poter sviluppare gli ovuli. Il tempo che separa il pasto di sangue e la deposizione della uova è detto *ciclo gonotrofico*. I flebotomi adulti vivono in media quattro settimane per cui compiono il ciclo gonotrofico tre o quattro volte.

Per poter valutare il rischio di trasmissione in una determinata zona, e quindi stabilire le opportune misure di controllo, è necessario definire le capacità vettoriali delle specie di flebotomi presenti e quindi la pericolosità epidemiologica.

La capacità vettoriale viene condizionata da:

- Densità di popolazione. Un numero maggiore di flebotomi determina una maggiore frequenza media di punture (in una zona endemica un animale può ricevere decine di punture a notte).
- La durata della vita dei flebotomi. Più è lunga la loro vita, maggiore è la possibilità di infezione. La durata della vita di un flebotomo dipende dalla specie di flebotomo e da fattori climatici come la temperatura e l'umidità relativa. Da questi fattori dipende anche la metaciclogenesi, infatti temperature e umidità elevate riducono il tempo che occorre agli amastigoti ingeriti di trasformarsi in promastigoti infettanti. La combinazione tra l'aspettativa di vita e la durata della metaciclogenesi si traduce in un maggiore o minore rischio epidemiologico.
- Durata del ciclo gonotrofico. Una volta infettato, il flebotomo è capace di trasmettere la *Leishmania* ad ogni pasto che realizza per tutta la vita. Per cui i flebotomi che realizzano un solo pasto per ogni ovulazione rappresentano un minor rischio epidemiologico a differenza di quelli che hanno bisogno di alimentarsi più frequentemente.

La trasmissione è inoltre influenzata da una serie di fattori legati all'eziologia dell'insetto: se pungono all'interno o all'esterno delle abitazioni, di notte o di giorno, se sono endo o esofilici. Gli insetti che pungono all'interno delle abitazioni durante la notte, e riposano all'interno



dell'abitazione dopo il pasto (endofilici), sono più facilmente controllabili attraverso l'uso di barriere meccaniche o insetticidi. È interessante ricordare che, al contrario di altri ditteri di interesse sanitario (mosche, zanzare), le popolazioni italiane di flebotomi sono ancora molto suscettibili ai comuni insetticidi di uso domestico. Anche se alcune caratteristiche biologiche di questi insetti (per esempio la dispersione e l'ubiquità dei focolai larvali, la spiccata esofagia ed esofilia – cioè la tendenza a pungere e riposarsi all'esterno) non permettono l'uso mirato di insetticidi ambientali, si sono rivelati promettenti i metodi di controllo basati sull'effetto repellente e di protezione dalla puntura, come i collari per cani impregnati di insetticida.

1.3 IL SERBATOIO

Si definisce serbatoio di una malattia l'animale che garantisce la sopravvivenza dell'agente eziologico e la sua successiva trasmissione. Nel caso della leishmaniosi, il serbatoio principale, per essere considerato tale, deve rispondere ad alcuni requisiti:

- la relazione tra animale (serbatoio) e vettore deve essere stretta
- l'animale deve essere ben rappresentato all'interno della nicchia ecologica in cui si manifesta la malattia ed essere abbastanza longevo da assicurare una fonte di alimentazione per i flebotomi
- nell'animale serbatoio l'infezione deve assumere un decorso cronico in modo che i parassiti siano presenti in quantità e tempo sufficiente per assicurare l'infezione degli insetti vettori
- la enzoozia deve essere sufficientemente prevalente da giustificare i casi umani (il contatto tra flebotomi ed uomo deve essere assicurato)
- le *Leishmanie* isolate dal reservoir, caratterizzate con tecniche biochimiche, devono essere le stesse che infettano l'uomo ed i vettori presenti nella stessa nicchia ecologica.

Al contrario, si definisce serbatoio secondario un animale che riunisce tali caratteristiche solo parzialmente, indicando quindi che la relazione con il



protozoo è recente e pertanto instabile.

La leishmaniosi si definisce zoonosi quando il serbatoio è animale, o antropozoonosi se il reservoir è l'uomo; la maggior parte dei casi appartiene al primo gruppo e, come ovvio, le misure di controllo sono differenti.

Si riconosce come antropozoonosi la leishmaniosi viscerale causata da *L. donovani* e la leishmaniosi cutanea causata da *L. tropica*. Recentemente sono state proposte come antropozoonosi anche le forme di leishmaniosi sostenute da *L. infantum* ed associate al virus dell'immunodeficienza umana (HIV) nei soggetti tossicodipendenti nei quali l'azione del flebotomo viene sostituita dalla siringa (Alvar *et al.*, 1996).

Il cane è considerato l'anello che unisce ciclo selvatico (mantenuto da serbatoi selvatici e flebotomi) e ciclo domestico; esso rappresenta il serbatoio principale nella diffusione della leishmaniosi viscerale umana sostenuta da *L. infantum* nel Vecchio e Nuovo Mondo (Courtenay *et al.*, 2002; Alvar *et al.*, 2004).

La volpe (*Vulpes vulpes*) ed il lupo (*Canis lupus*) rappresentano serbatoi selvatici della malattia: numerose sono state le segnalazioni di volpi infette, e tale animale è ritenuto responsabile dell'introduzione dell'infezione nei territori indenni (Fisa *et al.*, 1999; Criado-Fornelio *et al.*, 2000); nel lupo, la leishmaniosi è stata riscontrata raramente, con casi isolati segnalati in Calabria ed in Iran (Macri *et al.*, 1997; Mohebbi *et al.*, 2005). Anche nel Vecchio Mondo, il lupo insieme allo sciacallo (*Canis aureus*) possono essere parassitati, però la bassa densità di questi animali e la lontananza dall'uomo li relega su un piano secondario come serbatoi. In America esiste un ciclo silvestre mantenuto da mammiferi selvatici, rappresentati da almeno 40 specie tra roditori, sudenti (bradipi e formichieri), marsupiali (gambà), canidi (volpi) e primati.

L'infezione naturale da *Leishmania* nel gatto è molto rara e limitata a forme puramente cutanee. Sfortunatamente, queste alterazioni cutanee sono spesso aspecifiche e possono essere associate ad altre alterazioni dermatologiche che compaiono frequentemente nei gatti. È forse per tale ragione che l'infezione da *Leishmania* in questa specie sfugge all'esame clinico e, di conseguenza, il gatto è considerato un ospite occasionale (Poli *et al.*, 2002).



La malattia è endemica in tutto il Bacino del Mediterraneo, con segnalazione di casi autoctoni nel cane (quindi di presenza del flebotomo infetto) anche in regioni fino ad oggi considerate indenni, quali quelle italiane della fascia prealpina. Questo dato potrebbe essere correlato ai notevoli cambiamenti climatici cui stiamo assistendo in questi ultimi anni che possono aver modificato il comportamento biologico degli insetti vettori, anticipando e prolungando la stagione di attività e la colonizzazione dei territori notoriamente considerati indenni. Le numerose segnalazioni di casi di leishmaniosi canina provenienti da aree tradizionalmente ritenute indenni debbono portare alla conclusione che non esistono zone comunemente abitate che possano essere considerate completamente sicure. Infatti, se fino al 1989 il Nord Italia era considerato praticamente indenne dalla leishmaniosi canina, oggi sono stati accertati focolai in Veneto, Emilia Romagna, Piemonte ed altri probabili in Trentino e Lombardia (Natale, 2004).

Nonostante il progredire degli studi epidemiologici, la reale incidenza della leishmaniosi canina non è a tutt'oggi conosciuta, anche se vi sono segnalazioni di focolai in alcune regioni italiane (compresa la Campania), spagnole e greche nei quali la prevalenza dell'infezione raggiunge il 30 – 40 %, con punte, in alcuni casi, del 70%.

1.4 LA MALATTIA NELL'UOMO

A differenza del cane, l'uomo è molto più resistente all'infezione da *L. infantum* o alla sua manifestazione clinica. In genere, quindi, gli individui colpiti da leishmaniosi viscerale sono bambini al di sotto di due anni di età (nei quali il sistema immunitario è ancora immaturo), soggetti immunodepressi (HIV positivi, organo-trapiantati) o che comunque presentano condizioni fisiopatologiche predisponenti. Nel resto della popolazione sana l'avvenuto contatto uomo-parassita può essere valutato con l'uso di reazioni intradermiche specifiche, che rivelano in genere un'elevata percentuale di infezioni asintomatiche in aree di endemia. La loro frequenza aumenta con l'aumentare dell'età, cosicché nei focolai più attivi



oltre il 40% della popolazione adulta risulta positiva.

Nello scorso decennio, le co-infezioni HIV-*Leishmania* hanno avuto un grande impatto sanitario in tutto il sud Europa, dove sono stati recensiti circa 1.200 casi soprattutto in Spagna, sud della Francia ed Italia. Oltre alla trasmissione naturale tramite flebotomo infetto, tra i tossicodipendenti è stata dimostrata una trasmissione di tipo artificiale tramite scambio di siringa (Alvar *et al.*, 2006).

Dopo l'introduzione di terapie anti-HIV altamente efficaci nel 1998-1999, l'incidenza dei casi clinici di leishmaniosi in questi individui è diminuita, ma il problema sanitario persiste in quanto di tipo cumulativo: infatti nessuno dei soggetti infetti guarisce dalla leishmaniosi, per cui sono richiesti continui cicli di terapia con problemi di tossicità e di resistenza antiparassitaria.

Oltre l'HIV e le terapie immunosoppressive anti-rigetto, altri fattori fisiopatologici predisponenti sembrano essere lo stato di gravidanza e di malnutrizione, e una serie di patologie concomitanti quali l'epatite cronica, il diabete mellito e la tubercolosi polmonare. Solo in una piccola percentuale di adulti non si riscontrano apparenti fattori di rischio.

La malattia ha una lunga incubazione, in media sui 4-6 mesi, e l'esordio è caratterizzato da una febbre irregolare accompagnata da una progressiva anemia, ingrossamento della milza, e le analisi di laboratorio rivelano una riduzione più o meno severa degli elementi cellulari del sangue ed un aumento delle γ -globuline, con successiva anemia, deficit del sistema immunitario ed alterazioni della funzione piastrinica. Il sospetto di una leucemia, con cui la malattia può essere confusa soprattutto nei bambini, porta spesso alla diagnosi occasionale di leishmaniosi in seguito alla valutazione dei campioni di midollo osseo prelevati per la diagnosi.

Nell'uomo si distinguono varie manifestazioni cliniche di diversa gravità riassumibili in tre gruppi:

- Leishmaniosi viscerale: è una reticoloendoteliosi sistemica. Comporta febbre irregolare, progressiva anemizzazione, epato e splenomegalia di grado notevole, compromissione della serie granulocitaria e piastrinica



con possibile esito letale per emorragie terminali o infezioni intercorrenti. L'infezione viscerale può rimanere asintomatica o può diventare sintomatica con un decorso acuto. Il periodo di incubazione è di solito compreso tra poche settimane ed alcuni mesi, ma può durare anche anni. Mentre il termine generico leishmaniosi viscerale si riferisce ad un ampio spettro di manifestazioni cliniche più o meno gravi, il termine kala-azar (traduzione in lingua hindi di "febbre nera", a indicare che la pelle può diventare di colorito scuro) evoca in genere l'immagine classica di pazienti estremamente cachettici, febbricitanti, gravemente parassitati e con malattia letale.

Alcuni pazienti sviluppano una leishmaniosi post-kala-azar. Questa sindrome si manifesta con lesioni cutanee che includono macule pigmentate o depigmentate, papule, noduli e chiazze, localizzate soprattutto al volto. Tali lesioni si possono sviluppare durante il trattamento, a pochi mesi dall'inizio della terapia (come in Africa orientale), oppure dopo anni dalla fine della terapia (come in India).

I soggetti con lesioni cutanee persistenti possono fungere da serbatoio dell'infezione.

La malattia predilige l'età adulta in India, Africa e Sud-America, e quella pediatrica nel bacino del Mediterraneo.

Nelle aree di endemia la diagnosi si basa sull'anamnesi e sull'esame obiettivo. Negli individui non indigeni e nelle prime fasi delle epidemie, l'esordio è improvviso, con comparsa di febbre irregolare e ricorrente e sudorazioni notturne. Evolve poi con calo ponderale, grande spossatezza, anoressia, epato-splenomegalia, pancitopenia e iper- γ -globulinemia. Nei pazienti che vivono in zone endemiche, l'esordio della malattia è molto insidioso e può decorrere in modo non evidente per molto tempo. Nei casi non trattati precocemente i pazienti appaiono molto sofferenti e cachettici ed assumono un tipico colorito grigiastro.

La leishmaniosi viscerale è attualmente considerata un'importante infezione opportunistica tra i soggetti infettati da HIV nelle aree geografiche dove le due infezioni sono endemiche. Fino ad oggi sono state riportati numerosissimi casi di coinfezione, specialmente nelle aree



endemiche dell'Europa meridionale. Nei pazienti affetti da HIV, anche ceppi scarsamente patogeni possono avere una diffusione viscerale.

- Leishmaniosi cutanea: la leishmaniosi cutanea è caratterizzata dal confinamento della patologia a livello cutaneo. In assenza di segni generali, ha solitamente un decorso benigno ed è classificata come “del Nuovo Mondo” (americana) e “del Vecchio Mondo” (europea). Alcuni dei nomi dati localmente alla malattia del “Nuovo Mondo” sono *ulcera del chiclero*, *pian boin* ed *uta*; quelli dati alla malattia “del Vecchio Mondo” sono *piaga d'oriente*, *bottone d'oriente*, *pustola di Aleppo* e *piaga di Bagdad*.

Il periodo di incubazione varia da settimane a mesi; la prima manifestazione clinica è di solito una pustola nel punto del morso del flebotomo, ma nell'infezione da *L. (V.) braziliensis* può esservi anche una linfadenopatia regionale (talvolta bubonica). Si distinguono due varietà di leishmaniosi cutanea: una secca prevalentemente urbana, causata da *L. tropica*, in cui il serbatoio principale è l'uomo; l'altra forma, umida, rurale, causata da *L. major*, in cui i serbatoi sono alcuni roditori selvatici. Agli estremi delle varietà cliniche cutanee descritte esistono forme poliparassitarie e oligoparassitarie rappresentate da sindromi rare, rispettivamente la leishmaniosi cutanea diffusa (LCD) e la leishmaniosi recidivans, entrambe notoriamente difficili da curare. La LCD, provocata da *L. aethiopica* (Vecchio Mondo) e dal *complex* di *L. mexicana* (Nuovo Mondo) si sviluppa nel contesto di una reazione specifica verso la *Leishmania* e si manifesta con lesioni cutanee croniche e non ulcerose. La leishmaniosi recidivans, una variante iperergica con basso numero di parassiti, è solitamente sostenuta da *L. tropica* e si manifesta con una lesione solitaria cronica localizzata alle guance che si espande lentamente nonostante la guarigione centrale. In Italia la leishmaniosi cutanea è sostenuta da ceppi dermatropi di *L. infantum* ed è l'unica forma cutanea conosciuta nel nostro Paese. La lesione si produce nel sito della puntura del flebotomo sotto forma di un indurimento eritematoso a lenta evoluzione che non risponde a terapia convenzionale.



Nell'arco di alcune settimane la lesione si ulcera con tendenza alla guarigione spontanea.

- *Leishmaniosi muco-cutanea*: l'infezione da *Leishmania* delle mucose del nasofaringe è una complicanza metastatica della leishmaniosi cutanea relativamente rara, ma potenzialmente deturpante. Si tratta di una forma per lo più localizzata alla mucosa oro-faringea e nasale, che da una circoscritta lesione ulcerativa iniziale tende ad estendersi progressivamente, con distruzione di tessuti e quadri lesionali polimorfi.

Se la malattia viene diagnosticata in tempi brevi, la terapia è molto efficace e non dà luogo a ricadute. Nella fase clinica l'infezione umana è di tipo "chiuso", cioè la presenza di parassiti nel sangue periferico e nel derma è un evento raro per cui il paziente non può fungere a sua volta da serbatoio, come avviene per il cane.

La Campania costituisce attualmente il principale "macrofocolaio" di malattia umana di tutto il sud Europa, con un'incidenza tale da giustificare la creazione di un centro di riferimento pediatrico presso il Dipartimento di Pediatria dell'Azienda Ospedaliera Santobono-Pausilipon di Napoli, con il nome di Centro Regionale di Riferimento per la Leishmaniosi Viscerale Pediatrica, con 255 casi diagnosticati e trattati dal 1990 al Marzo 2004 (di Martino *et al.*, 2004). Le zone di endemia appartengono tutte alle province di Napoli, Caserta e Salerno. Da una decina di casi registrati con sorveglianza attiva nel 1990, l'incidenza è andata progressivamente aumentando fino ad un primo picco di 65 casi nel 1995, ed ad un ulteriore picco di 83 casi nel 2000 (Figura 7). Negli ultimi anni l'incidenza si è stabilizzata su 60-70 casi/anno. In tutto questo periodo il 50% circa delle infezioni si è verificato nei comuni Vesuviani e territori limitrofi. I casi pediatrici (<15 anni di età) hanno rappresentato il 50% dei soggetti. Per tentare di arginare la diffusione della malattia, probabilmente ancora sottostimata sia nell'uomo che nel cane, la Regione Campania nell'anno 2002 ha emanato delle norme per il controllo della leishmaniosi canina, che andrebbero rivisitate alla luce delle recenti acquisizioni scientifiche.



In America le leishmaniosi predominano in regioni a clima caldo-umido, solitamente sotto gli 800 metri di altitudine, con alcune eccezioni per le regioni andine di Perù, Ecuador e Venezuela, dove si possono trovare fino a 1.800 metri. Sono presenti nelle zone rurali e in quelle silvestri a recente insediamento umano.

Le leishmaniosi tegumentarie americane si comportano come una malattia professionale, colpendo i coltivatori del caucciù (*“chicleros”* e *“seringueiros”*) e del cacao, i minatori (*garimpeiros*), i disboscatori, i taglialegna ed i costruttori di strade nelle foreste.

Sono sempre più frequenti epidemie di leishmaniosi viscerale nelle periferie delle grandi città sudamericane, e anche le leishmaniosi tegumentarie da silvestri e rurali che erano, stanno diventando sempre di più peri-urbane.

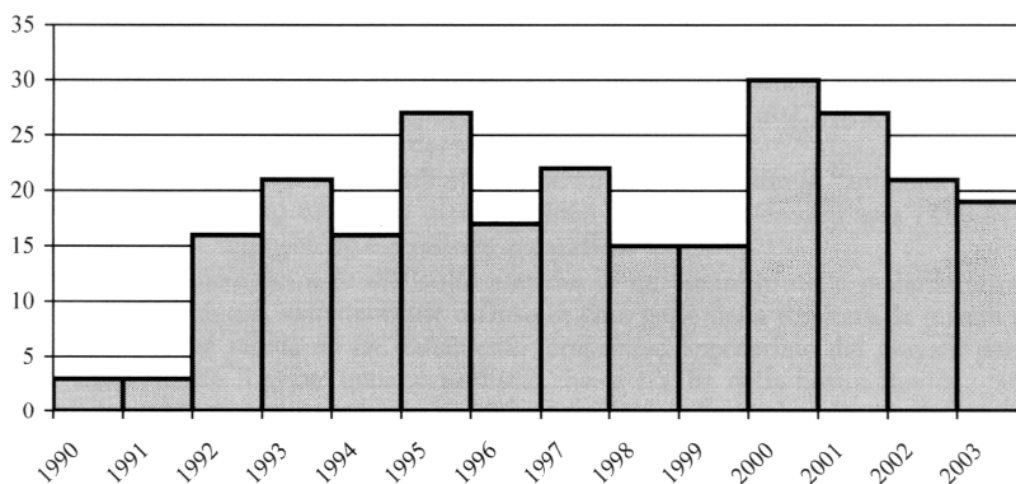


Figura 7. Andamento annuale dei casi di leishmaniosi viscerale infantile ricoverati presso il Centro Regionale di Riferimento per la Leishmaniosi Viscerale Pediatrica della Campania (di Martino *et al.*, 2004).



2. CICLO BIOLOGICO E PATOGENESI

La leishmaniosi è un eccellente esempio di interazione parassita-ospite.

Il vettore del genere *Phlebotomus* (nel vecchio mondo) o *Lutzomyia* (nel nuovo mondo) s'infetta compiendo un pasto di sangue su un individuo infetto o su un animale serbatoio. Il vettore ingerisce così i macrofagi contenenti gli amastigoti di *Leishmania*. Giunti nello stomaco, gli amastigoti immediatamente si trasformano nella forma flagellata, mobile, i promastigoti. Questi migrano lungo il tratto digerente del vettore, moltiplicandosi per scissione binaria e vanno a localizzarsi nella proboscide. Quando il vettore compie un nuovo pasto di sangue, pungendo un altro ospite, gli trasferisce i promastigoti metaciclici infettanti di *Leishmania* insieme alla saliva. La saliva del flebotomo femmina, contiene alcune molecole a diverse attività biologica (apirasi, maxadilan, 5'nucleotidasi, ialuronidasi etc.), sostanze ad attività anti-aggregante piastrinica, vasodilatatrice e di promozione della diffusione del parassita nei tessuti (ialuronidasi). Prove sperimentali hanno consentito di dimostrare che le sostanze vasoattive contenute nella saliva del flebotomo hanno la facoltà di inibire la capacità dei macrofagi di presentazione dell'antigene ai linfociti T, nonché l'attività microbica degli stessi, con riduzione della produzione di ossido nitrico (NO) e altri metaboliti dell'ossigeno. Studi condotti sui macrofagi murini e canini hanno dimostrato che l'NO è uno delle principali molecole microbicide implicate nella morte degli amastigoti di *Leishmania* sia in vitro che in vivo (Barbieri, 2006).

Una volta nell'ospite, i promastigoti si legano ad alcune molecole di superficie dei macrofagi (come i recettori del complemento 1 e 3 -CR1 e CR3-) e vengono così fagocitati. Una volta che il fagosoma si fonde con i lisosomi secondari si ha la formazione del vacuolo parasitoforo, all'interno del quale i promastigoti metaciclici si trasformano nuovamente nella forma amastigote intracellulare. Questa trasformazione comporta la perdita di una molecola di superficie, chiamata lipofosfoglicano (LPG), che, migrando sulla superficie dei macrofagi infetti, inibisce il burst ossidativo post-fagocitosi e l'attività idrolitica degli enzimi lisosomiali, mediante la



chelazione del calcio e l'inibizione della protein chinasi C prodotta dalle cellule infette (Turco and Descoteaux, 1992). Questa azione può essere interpretata come un meccanismo in uso dal parassita per sopravvivere e moltiplicarsi indisturbato all'interno dei macrofagi fino a provocarne la rottura, con la conseguente possibilità di parassitare altre cellule e disseminare attraverso la via ematica e linfatica (Awashi *et al.*, 2004).

L'inibizione dell'attività dei macrofagi è indotta anche dalla presenza sulla superficie del parassita di altre sostanze, quali: proteasi, come la gp63, una zinco-metalloproteasi che è in grado di inattivare gli enzimi proteolitici dell'ospite ed impedire la degradazione fagolisosomiale; antigeni, tra cui una fosfatasi acida che, insieme ai LPG rilasciati dalla superficie, può modificare la risposta immunitaria dell'ospite; altri enzimi presenti solo negli amastigoti (glutazione perossidasi, superossido dismutasi e catalasi), che contribuiscono a degradare i metaboliti tossici prodotti dai processi ossidativi dei macrofagi; glicoinositolfosfolipidi (GILP), presenti in elevata quantità sulla superficie sia dei promastigoti che degli amastigoti che hanno la funzione di proteggere il parassita dall'ambiente esterno (Corazza *et al.*, 1999).

Studi sperimentali nell'uomo e nel modello murino hanno dimostrato che l'esito dell'infezione è strettamente correlato al tipo di risposta immunitaria che viene innescata. In particolare, il controllo dell'infezione o l'evoluzione della malattia sono legate alle popolazioni di linfociti T, CD4⁺ e CD8⁺, responsabili del riconoscimento degli antigeni (Ag) presentati dai macrofagi e dell'attivazione dell'immunità cellulo-mediata o umorale. È stato dimostrato che nei cani naturalmente infetti con *L. infantum* si assiste ad una riduzione sia dei linfociti CD4⁺ che dei CD8⁺, ed ad un loro aumento dopo trattamento farmacologico (Barbieri, 2006).

E' opinione comune che il momento cruciale nell'evoluzione della malattia è rappresentato, nei primi istanti dell'infezione, dalla capacità dei macrofagi di intervenire con meccanismi di killing efficaci nei confronti del parassita. Inoltre, la presenza di determinate citochine può svolgere un'azione favorevole nell'indurre resistenza alla malattia, influenzando l'attività leishmanicida dei macrofagi.

Nel modello murino di infezione da *Leishmania*, le citochine prodotte dalle cellule T CD4⁺ sono determinanti nello sviluppo dell'infezione: le cellule T helper-1 (Th1) producendo interferone- γ (IFN- γ) ed interleuchina-2 (IL-2) forniscono protezione contro il parassita, mentre le cellule T helper-2 (Th2) producendo interleuchina-4 (IL-4) e interleuchina-10 (IL-10) permettono la comparsa della malattia (Figura 8).

L'esistenza di linee genetiche di topi sensibili o resistenti all'infezione dimostrerebbe, inoltre, la natura prettamente genetica multifattoriale della predisposizione alla malattia. A tal proposito, Locksley *et al.* (1999) hanno dimostrato che la sensibilità dei topi BALB/c alla *L. major*, è conseguenza di un riconoscimento aberrante degli epitopi antigenici di *Leishmania* (in particolare di LACK) da parte dei linfociti T CD4⁺, con conseguente produzione esagerata di IL-4 e alterata produzione di IL-12 da parte delle APC (Antigen Presenting Cells).

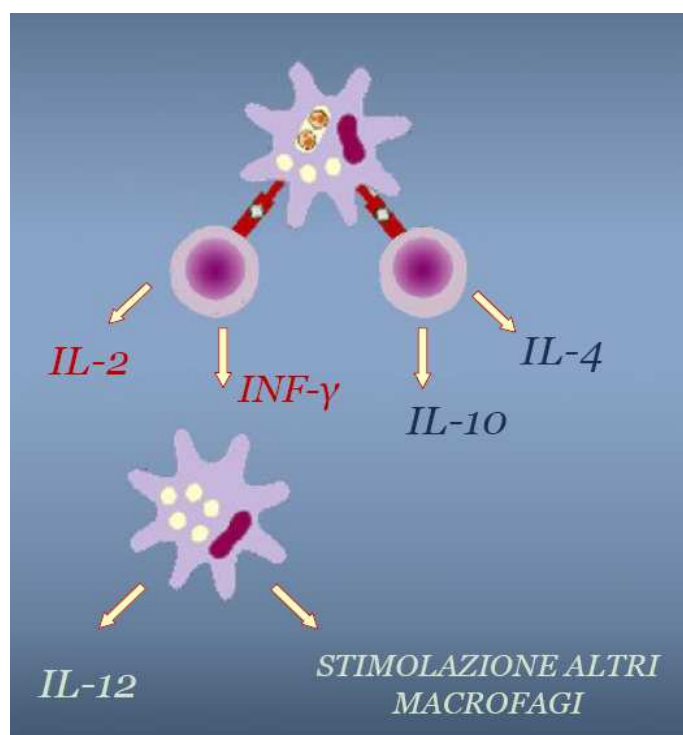


Figura 8. Rappresentazione schematica della risposta immunitaria mediata dalle cellule T CD4⁺.



Nell'uomo, una risposta Th1 specifica con produzione di IFN- γ garantisce il controllo dell'infezione, mentre una debole risposta Th1 ed un aumento della produzione di IL-10 sono responsabili della progressione dell'infezione e della malattia clinica (Bracelente *et al*, 2005; Barbieri, 2006).

A tutt'oggi non è ancora ben chiaro il meccanismo con cui la *Leishmania* modula le diverse sottopopolazioni di linfociti CD4⁺ e purtroppo gran parte delle conoscenze attuali sulla immunopatogenesi della malattia sono frutto di sperimentazioni condotte *in vitro* sul topo e dalle conoscenze di immunologia umana, la cui estrapolazione alla situazione immunologica nel cane non è sempre priva di rischi interpretativi (Prélaud, 2003). In [Tabella 2](#) sono indicati i principali fattori che influiscono sulla polarizzazione verso la risposta Th1 o Th2.

Nel cane, lo sviluppo della leishmaniosi viscerale è altamente variabile: alcuni cani infetti possono sviluppare un'infezione sintomatica che può portare a morte l'animale, altri invece restano asintomatici o sviluppano uno o più sintomi di entità media, i cosiddetti oligosintomatici. È stato dimostrato che i cani sintomatici presentano un basso livello di linfociti CD4⁺, rispetto ai soggetti asintomatici (Rosypal *et al.*, 2005b). Barbieri (2006) ha dichiarato che i cani con leishmaniosi viscerale sintomatica se da un lato presentano alti livelli di anticorpi anti-*Leishmania* non protettivi, dall'altro presentano alterazioni immunologiche caratterizzate da un ritardo dell'ipersensibilità di tipo ritardato (DTH) agli antigeni *Leishmania*, da una riduzione delle cellule linfocitarie nel sangue periferico e dall'assenza di produzione *in vitro* di citochine, IFN- γ e IL-2, da parte di cellule mononucleari di sangue periferico (PBMC).

È risaputo che nell'ambito della popolazione di linfociti CD4⁺ si hanno due sottopopolazioni fenotipiche: i Th1 ed i Th2. La resistenza alla leishmaniosi viscerale è stata associata con l'attivazione del fenotipo linfocitario T helper 1 (Th1). I linfociti Th1, agendo mediante un meccanismo autocrino di proliferazione IL-2 dipendente, inducono la proliferazione cellulare e la secrezione di linfocine tipiche di questo subset linfocitario (IL-2, INF- γ , TNF- α e IL-12).



Essi così si rendono responsabili della risoluzione dell'infezione e quindi della protezione dei soggetti infetti (Barbieri, 2006; Manna *et al.*, 2006).

L'IL-2 stimola la proliferazione e/o differenziazione degli altri subset linfocitari, ad eccezione dei linfociti Th2. L'azione più tipica è quella di indurre la maturazione e la differenziazione dei linfociti T pre-citolitici a linfociti T citotossici.

L'INF- γ agisce in particolare sui macrofagi attivandoli ed inducendo un'efficace azione effettrice diretta nei confronti dei microrganismi a crescita endocellulare, e quindi anche della *Leishmania*.

I macrofagi, a loro volta, producono l'IL-12 che favorisce l'espansione dei Th1 protettivi ed inibisce quella dei Th2 non-protettivi (Manetti *et al.*, 1993). È opportuno sottolineare che il ruolo dell'IL-12 nell'induzione e nel mantenimento della risposta immunitaria di tipo Th1 è stato poco studiato nella leishmaniosi viscerale canina (Barbieri, 2006).

Al contrario, la prevalente produzione di IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e del fattore di stimolazione dei linfociti B (BSF-1) ad opera del fenotipo Th2, è responsabile della progressione dell'infezione verso la malattia, in seguito all'attivazione di una risposta immunitaria prevalentemente di tipo umorale non protettiva, esitante nella produzione di anticorpi specifici (IgG). Le sostanze prodotte dai Th2 non proteggono l'organismo dall'aggressione delle *Leishmanie* perché richiamano, nel sito di partenza dell'infezione, macrofagi immaturi a bassissimo potenziale antiparassitario; favoriscono anzi l'evoluzione della malattia, in quanto permettono una persistenza delle *Leishmanie* "protette" all'interno dei macrofagi ed una loro diffusione sistemica.

La ricerca delle sottoclassi degli anticorpi IgG anti-*Leishmania*, IgG1 e IgG2, è un indicatore più veritiero dello stato della leishmaniosi canina rispetto allo studio delle IgG totali. Infatti, è stato dimostrato che i cani infetti con *L. infantum* presentano alti livelli di IgG1 anti-*Leishmania*, mentre gli anticorpi IgG2 sono prerogativa dell'infezione asintomatica. È interessante ricordare che dati più recenti hanno dimostrato un'elevata espressione di IgE, accanto alle IgG1, nei cani sintomatici provenienti da aree endemiche differenti, ipotizzando il loro potenziale uso come markers



di malattia attiva (Barbieri, 2006).

I linfociti Th1 antagonizzano l'azione dei Th2 in quanto l'INF- γ da essi prodotto, inibendo direttamente gli effetti della IL-4 sui linfociti B, ne sopprime la funzione. Inoltre, l'azione di stimolo esercitata sui macrofagi, oltre ad aumentare il "killing" nei confronti dei microrganismi endocellulari, determina una maggiore produzione di IL-12.

I linfociti Th2, nel pattern di citochine prodotte annoverano l'IL-4 e l'IL-10 che inibiscono la risposta proliferativa dei linfociti Th1, bloccandone la funzione. Mentre nell'uomo in corso di infezione da *L. chagasi*, la produzione di IL-10 è stata correlata con lo sviluppo della patologia, i dati scientifici relativi al ruolo di questa citochina nella fase sintomatica della leishmaniosi viscerale canina sono ancora controversi (Barbieri, 2006).

In seguito all'attivazione del pattern linfocitico Th2 si ha una massiva proliferazione di linfociti B, plasmacellule, istiociti e macrofagi, con incremento della chemiotassi per gli eosinofili, con conseguente linfadenomegalia, epato-splenomegalia ed elevata iper- γ -globulinemia.

La risposta anticorpale che si innesca non è protettiva per il cane infetto, dal momento che la continua sollecitazione delle cellule immunocompetenti, indotta dai parassiti posti al riparo nei fagociti, comporta uno squilibrio del sistema immunitario, con iperfunzione della risposta umorale, anomalie in quella cellulo-mediata e conseguente produzione di uno stato immunopatologico caratterizzato essenzialmente da immunodepressione e dalla produzione di immunocomplessi (Ic) circolanti.

Le lesioni organiche e tissutali che più comunemente si riscontrano nella leishmaniosi del cane sono costituite, appunto, da vasculiti, poliartriti, ulcerazioni cutanee, uveiti, glomerulonefriti, tutte espressioni dello squilibrio immunologico che viene innescato dal parassita. La patologia da Ic non è però causata dalla loro deposizione fisica nei distretti vascolari, bensì dall'attivazione del complemento (C') e dal fenomeno infiammatorio che si innesca come conseguenza di questo processo.

Pochi studi sono stati condotti sul ruolo dei linfociti CD8⁺ nel meccanismo di resistenza alla leishmaniosi canina. Questi linfociti sono stati evidenziati nei cani asintomatici sperimentalmente infetti con *L. infantum* ma non nei



soggetti sintomatici, suggerendo che la lisi diretta dei macrofagi infettati con *L. infantum* mediante i linfociti T citotossici rappresenta un meccanismo aggiuntivo nella resistenza alla leishmaniosi viscerale canina (Barbieri, 2006).

Fattori genetici	Alcune razze sono più colpite, altre sono considerate resistenti (ad es. Ibizan Hound).
Carica antigenica	Alte cariche antigeniche inducono una risposta Th2 (Uzonna <i>et al.</i> , 2001).
Ormoni	Estrogeni, progesterone e cortisolo stimolano la risposta Th2 (Spellberg and Edwards, 2001).
Patologie concomitanti	La liberazione di catecolamine stimolano la risposta Th2 (Spellberg and Edwards, 2001). Ad es. un cane può ospitare il protozoo per mesi/anni, senza manifestare segni clinici. La contemporanea presenza di un'infezione da <i>Ehrlichia canis</i> può sconvolgere tale equilibrio e indurre una leishmaniosi in forma clinica.
Infestazione da zecche	Indirizza verso una risposta Th2.

Tabella 2. Fattori che influiscono sulla risposta immunitaria in corso di leishmaniosi.



3. SINTOMATOLOGIA

La leishmaniosi canina presenta una sintomatologia alquanto polimorfa e si manifesta come un disordine generalizzato ad andamento sub-acute o cronico, rapportabile alla forma viscerale dell'uomo, con un evidente ed imponente coinvolgimento cutaneo (forma viscerocutanea). A differenza di quanto avviene nell'uomo, raramente si osserva una fase acuta con la comparsa di febbre alta (di tipo remittente o intermittente), tremori diffusi ed esito fatale. Nonostante il contagio si verifichi nei periodi di massima presenza dei flebotomi (Maggio-Ottobre), la malattia non assume un carattere di stagionalità in relazione probabilmente al lungo periodo di incubazione, che sperimentalmente, è stato visto variare da un minimo di 1 anno ad un massimo di 6 anni (Ferrer, 1999). Questo fa sì che la diagnosi della patologia non viene agevolata dall'individuazione del periodo in cui insorgono le prime manifestazioni a carico del soggetto infetto.

Risultano maggiormente colpiti cani di età compresa fra i 3 e i 7 anni, di ambo i sessi, che vivono in ambiente extradomestico; meno colpiti sono i soggetti al di sotto dei 9 mesi d'età, i cani meticcii di razza autoctona ed i cani di piccola taglia (Koutinas *et al.*, 1999).

In base alle caratteristiche cliniche, al tipo di risposta immunitaria ed alla carica parassitaria, si possono distinguere diverse classi di cani leishmaniotici: asintomatici, oligosintomatici, sintomatici e marcatamente sintomatici.

Non sempre esiste una correlazione diretta tra quadro clinico e infestazione parassitaria, dal momento che esistono cani asintomatici con un livello di parassitosi molto elevato e, viceversa, soggetti con gravi manifestazioni cliniche ma con una parassitosi più modesta.

I sintomi classici dell'infezione risultano abbastanza complessi e vari: l'anamnesi può mettere in evidenza, inizialmente, un lento e progressivo dimagrimento, perdita di vivacità dell'animale, facile affaticamento, lieve o marcata disoressia, astenia, lesioni oculari, epistassi, zoppia, diarrea, anemia, lesioni cutanee. La temperatura corporea di solito è normale o sub-febbrile.



È sempre presente interessamento del sistema reticolo-endoteliale con coinvolgimento di linfonodi, fegato, milza e midollo osseo. La linfadenomegalia può essere sistemica oppure localizzata (di solito i linfonodi prescapolari sono più interessati dei poplitei, mentre i sottomandibolari sono quasi sempre coinvolti in modo attenuato). Alla palpazione i linfonodi si presentano aumentati di volume, non dolenti, di consistenza duro elastica, di aspetto iperplastico o perfino fibrosi al taglio. In taluni soggetti, in particolare quelli con soli problemi renali, la linfadenomegalia può essere assente. All'esame istologico figurano aspetti di diffusa proliferazione reticolo-istocitaria associata ad infiltrazione plasmacellulare. Molti macrofagi appaiono infarciti di *Leishmanie*. Simili alterazioni anatomo-patologiche si riscontrano anche nella milza.

Più raramente è stata riscontrata un'epatite cronica granulomatosa e la biopsia epatica ha messo in evidenza una diffusa infiltrazione di macrofagi ricchi di amastigoti, associata a piccole aree di necrosi.

L'immunodepressione può promuovere la presenza di infezioni concomitanti che complicano il quadro clinico.

Le lesioni cutanee sono varie e rappresentano le manifestazioni più comuni della malattia (Ordeix *et al.*, 2005). I sintomi classici includono generalmente una dermatite secca esfoliativa (cosiddetta furfuracea o amiantacea), non pruriginosa, associata ad alopecia bilaterale o ipotricosi, che di solito ha inizio a livello della testa e si estende poi al resto del corpo. Altri animali sviluppano ulcerazioni croniche, localizzate a livello delle prominenze ossee, delle giunzioni muco-cutanee e delle estremità degli arti. Più raramente si riscontrano dermatite pustolosa sterile o noduli cutanei multipli.

Secondo alcuni autori, la forma di dermatite nodulare è più comune nei cani di razza Boxer (Amara *et al.*, 2000); sebbene questa predisposizione non è stata confermata in altri studi (Koutinas *et al.*, 1993).

In [Figura 9](#) sono rappresentate alcune immagini patognomoniche della leishmaniosi cutanea.



a)



b)



c)



d)

Figura 9. Esempi di lesioni cutanee in corso di leishmaniosi:

- a) Eczema furfuraceo con zone alopeciche ed ulcere sulla testa e sulle orecchie.**
- b) Alopecia sul padiglione auricolare.**
- c) Lesioni ulcero-crostose, onicogrifosi, alopecie ed eczema furfuraceo.**
- d) Dermatite nodulare.**



All'esame della cute è possibile osservare la presenza di noduli o ispessimenti non ulcerati e non dolenti, di vario diametro, riferibili ad una reazione infiammatoria granulomatosa, il cui esame citologico mostra numerosi macrofagi parassitati, cellule giganti multinucleate ed un'infiltrazione linfo-plasmacellulare (Blavier *et al.*, 2001).

Secondo Blavier *et al.* (2001), la forma nodulare di solito non diffonde e presenta una prognosi piuttosto favorevole, probabilmente in conseguenza di un'adeguata risposta immunitaria (cellulo-mediata) che i cani sviluppano contro la *Leishmania*, a differenza di quanto avviene in altre forme di questa malattia. Deve essere comunque evidenziato che, in alcuni casi, la forma nodulare può essere un indice dell'insorgenza di una forma generalizzata della malattia con prognosi più sfavorevole.

Segni clinici un tempo caratteristici, quali la dermatite esfoliativa secca della zona periorbitale, nota come "segno degli occhiali", e l'onicogrifosi sono nettamente diminuiti d'incidenza, probabilmente per mutazioni dei ceppi di *Leishmania* (Koutinas *et al.*, 1993).

Il coinvolgimento dell'apparato muscolo-scheletrico si può manifestare con la presenza di atrofia muscolare (muscoli facciali e temporali), che conferisce all'animale il tipico aspetto di "cane vecchio"; con riduzione della tolleranza all'attività fisica; letargia; disturbi della locomozione (zoppie intermittenti). Questi ultimi possono essere dovuti a neuroalgie, poliartriti, polimiositi, artrosinoviti, ulcere interdigitali o ai polpastrelli, (Buracco *et al.*, 1997).

La poliartrite di solito è di tipo non-erosivo e può essere o meno associata a sinovite. Essa è il risultato di una reazione di ipersensibilità di tipo III, con deposito di Ig all'interno delle articolazioni, anche se i parassiti sono stati isolati dal liquido sinoviale o nei macrofagi delle membrane sinoviali (Santos *et al.*, 2006).

La palpazione delle diafisi delle ossa lunghe può evocare una certa dolorabilità, analogamente ai movimenti passivi di flesso-estensione delle articolazioni; la zona di osso affetta è quella relativa all'arteria nutritizia attraverso la quale sembra avvenire la diffusione dell'infezione (Bizzeti *et al.*, 1989).



L'esame radiologico delle ossa lunghe mette in evidenza estese lesioni periostali a carattere proliferativo e, occasionalmente, interessamento delle articolazioni e/o delle sinovie, con incremento della radiopacità intramidollare corrispondente alla sclerosi ossea (Blavier *et al.*, 2001) (Figura 10). Dall'esame biotico dell'osso e/o dal prelievo del liquido sinoviale si possono isolare gli amastigoti. Questo può far ipotizzare un'infezione diretta delle strutture interessate. Tali forme di interessamento osteo-articolare rispondono al trattamento con farmaci steroidei, in associazione a quello chemioterapico specifico. Nei casi di lesioni proliferative, la diagnosi differenziale deve comprendere le osteomieliti batteriche e fungine, i tumori metastatici e le panosteiti; nei casi di lesioni litiche, bisogna prendere in considerazione le artriti infettive, le poliartriti reumatoidi, il lupus eritematoso sistemico e la malattia degenerativa articolare (Turrel and Pool, 1982).

Le lesioni oculari, riscontrate nel 24% dei soggetti, sono molto varie e talvolta rappresentano gli unici segni della malattia. La loro eziopatogenesi è da riportare sia alla presenza del parassita stesso che al deposito di Ic. Le lesioni più comuni sono la dermatite periorbitale e la blefarite, sebbene non di raro si riscontri anche una cheratocongiuntivite bilaterale secca, causata da un danno diretto a carico dell'apparato lacrimale o dalla riduzione riflessa della secrezione conseguente ad ipoestesia corneale. Si osservano anche uveite linfoplasmacellulare o granulomatosa, generalmente bilaterale, associata ad edema corneale (Figura 11); granulomi sulla superficie iridea; e formazioni di sinechie (Garcia-Alonso *et al.*, 1996). Il glaucoma ad angolo chiuso può essere la conseguenza di gravi uveiti. Altre lesioni sono rappresentate dalle iriti, che possono essere di due tipi: granulomate, caratterizzate dalla presenza di piccoli granulomi sulla superficie iridea da cui è possibile isolare il parassita; non granulomate, le più frequenti, che si manifestano con miosi, iperemia ed edema irideo, con possibile formazione di sinechie posteriori ed insorgenza di glaucoma e cataratta secondaria. Meno frequenti sono le emorragie puntiformi o il distacco della retina. Nei casi particolarmente gravi si può arrivare ad un coinvolgimento di tutte le strutture oculari e quindi alla comparsa di panoftalmiti ed endoftalmiti.



Figura 10. Lesioni ossee ed articolari riferibili a poliartrite erosiva da *Leishmania*: si notino lesioni osteolitiche ed osteoproliferative delle ossa carpali; sclerosi ossea delle ossa metacarpali; tumazione articolare (Blavier *et al.*, 2001).



Figura 11. Uveite da immunocomplessi in corso di *Leishmania* e blefarite.



La *L. infantum* può causare infiammazione del tratto digestivo e pertanto va aggiunta alla lunga lista degli agenti infettivi o parassitari che causano coliti croniche, come la *Giardia*, la *Salmonella*, la *Yersinia*, il *Mycobacterium avium* (Blavier *et al.*, 2001). Ferrer *et al.* (1991) hanno riportato alcuni casi di coliti croniche con melena, i cui campioni biotici hanno evidenziato un'infiammazione granulomatosa ulcerativa della mucosa e la presenza di molti parassiti. Carrasco *et al.* (1997) hanno riportato un caso di leishmaniosi canina con diarrea emorragica associata ad una pancreatite acuta fatale. Gli autori hanno ipotizzato che tale pancreatite sia stata conseguenza di un'arterite necrotizzante legata ad una reazione di ipersensibilità di tipo III, dal momento che all'esame istologico sono stati riscontrati parassiti nella milza e nel linfonodo ma non nel pancreas del soggetto. È interessante ricordare che molti autori attribuiscono i sintomi digestivi, come il vomito e la diarrea, all'insufficienza epatica e renale che spesso complicano la leishmaniosi canina (Font *et al.*, 1994; Koutinas *et al.*, 1999).

L'anemia è un segno clinico frequente che chiama in causa diversi meccanismi patogenetici, quali l'aumento dell'attività emocateretica da parte del SRE splenico sui globuli rossi opsonizzati da Ic; la dispersione cronica di eritrociti in tutte le sedi dove è presente la flogosi; l'epistassi; e nei soggetti con problemi renali, la ridotta produzione di eritropoietina.

Solitamente l'anemia è normocitica, normocromica e scarsamente rigenerativa.

Sono stati osservati nel 5-10% dei cani episodi di epistassi, generalmente monolaterale. Sebbene le cause di ciò non sono completamente note, sembra che l'epistassi derivi da lesioni infiammatorie e ulcerative della mucosa nasale, piuttosto che da un disordine del meccanismo di coagulazione.

Nella leishmaniosi canina è relativamente comune riscontrare poliuria e polidipsia conseguenti ad una glomerulonefrite da Ic, che evolve in una progressiva insufficienza renale cronica o sindrome nefrotica con imponente proteinuria (Lopez *et al.*, 1996). L'insufficienza renale è la causa più frequente di morte degli animali affetti da leishmaniosi viscerale, ed in alcuni casi rappresenta l'unica alterazione responsabile della sintomatologia.



Dal punto di vista istologico, le lesioni primarie a livello renale coinvolgono le strutture glomerulari (glomerulonefrite di tipo mesangiale, membranosa, membrano-proliferativa o segmentale focale), e solo in un secondo momento si ha un interessamento tubulointerstiziale. Glomerulo-amiloidosi secondarie sono state solo occasionalmente descritte.

Paresi del treno posteriore, zoppie, tremori, iperestesie generalizzate, associate a febbre serale e debolezza generalizzata, rappresentano i sintomi che indicano un coinvolgimento del sistema nervoso (possibile generalmente solo nei cani giovani [6 mesi-3 anni]). Non è stata ancora chiarita l'eziopatogenesi di tali reperti, per i quali sono state evocate nevralgie aspecifiche. Ciò nonostante, recenti studi hanno messo in evidenza la presenza di macrofagi parassitati da amastigoti nel sistema nervoso centrale (plessi corioidei) di cani infetti senza sintomi neurologici importanti. Secondo alcuni autori la presenza del parassita nel sistema nervoso si verificherebbe soltanto nell'ultimo stadio della malattia e sarebbe limitata alle meningi ed ai plessi corioidei. Devono, comunque, essere ulteriormente approfondite le conoscenze relative alla capacità posseduta dalla *Leishmania* di invadere i tessuti nervosi ed indurre sintomatologie specifiche, soprattutto in seguito a segnalazioni di forme nervose nell'uomo, dove sono stati individuati amastigoti di *Leishmania* nel liquido cefalorachidiano in portatori di sintomi riferibili a meningoencefalite.

Lesioni infiammatorie a carico degli organi genitali maschili (epididimo, ghiande e prepuzio) sono abbastanza frequenti nei cani sierologicamente positivi per la leishmaniosi viscerale. Tra i sintomi meno comuni a carico dell'apparato genitale si possono segnalare il granuloma penieno (a livello del ghiande), ed una forma petecchiale peniena, caratterizzata da un'area anulare della larghezza di circa 4 mm, in cui è possibile evidenziare piccole zone, di circa 1-2 mm e di colorito rosso vivo, ricche di *Leishmanie* (esame citologico eseguito per impronta). Sono state anche riportate lesioni endometriali granulomatose nella cagna, responsabili di aborto nella fase avanzata della gravidanza (46°-48° giorno) (Diniz *et al.*, 2005).

Lesioni a carico dell'apparato cardiovascolare sono state solo occasionalmente descritte: Font *et al.* (1993), hanno descritto un caso di



pericardite fibrosa associata ad una forma di leishmaniosi viscerale; mentre Pumarola *et al.* (1991), hanno riportato due casi di vasculiti necrotizzanti sistemiche associate ad infezione da *Leishmania*, manifestatesi clinicamente con emorragie multiple in vari organi.

Valladares *et al.* (1998) hanno dimostrato che nei cani infettati sperimentalmente, la leishmaniosi può provocare una coagulazione intravascolare disseminata (DIC), che può essere responsabile di trombocitopenia, trombopatia, ed aumento del tempo della trombina e dei prodotti di degradazione della fibrina. Modificazioni dei tempi di coagulazione possono, però, essere secondari ad epatite cronica causata dalla presenza del parassita nel fegato (Font *et al.*, 1993; Carrasco *et al.*, 1997).

In presenza di più segni tipici, la diagnosi clinica di leishmaniosi può risultare abbastanza agevole, anche se deve essere sempre differenziata da altre affezioni (Rickettsiosi, linfoma, dermatiti parassitarie ed allergiche, etc.). Frequentemente la parassitosi decorre in forma subdola, con sintomi di lieve entità che possono indurre solamente al sospetto della patologia. In tutti i casi la conferma definitiva deve essere data dagli esami di laboratorio. Negli ultimi anni, però, accanto alle forme cliniche tradizionali compaiono dei quadri nuovi, privi dei sintomi tipici, in cui la sintomatologia patologica è riferibile esclusivamente al coinvolgimento di un solo organo o apparato.

Da un punto di vista anatomo-patologico, la lesione microscopica che si riscontra nella leishmaniosi canina è comunemente riferibile ad una reazione infiammatoria granulomatosa che interessa molti organi (cute, linfonodi, fegato, milza, rene, occhi, surrene, pancreas, intestino, testicoli), compreso il sistema nervoso centrale.

In tutti gli organi è possibile riscontrare:

- Aggregati cellulari costituiti da cellule epitelioidi, plasmacellule, linfociti, molti emolinfoblasti e cellule derivate con diverse *Leishmanie* nel loro citoplasma
- Elementi istiocitari (specie a carico del fegato e della milza) infarciti di emosiderina, espressione di un'attiva emocateresi
- Fenomeni di vasculite.



4. DIAGNOSI

La diagnosi clinica della leishmaniosi viscerale canina è resa difficoltosa dal suo straordinario pleomorfismo e dalla similitudine con altre malattie (Ferrer, 1999). La leishmaniosi canina viene sospettata dal medico veterinario in presenza di rilievi anamnestici (dimagrimento), fisici (dermatopatia furfuracea, linfadenomegalia) e clinici (iperglobulinemia, ipoalbuminemia e proteinuria), ma non esistendo segni caratteristici o patognomonic, il clinico deve ricorrere ad esami specifici per diagnosticarla o escluderla.

Di conseguenza, gli esami di laboratorio rivestono un ruolo di primaria importanza, in quanto consentono di confermare la diagnosi e rappresentano un sicuro elemento di giudizio sia ai fini prognostici che nel monitoraggio dell'andamento clinico in corso di terapia.

Questi esami possono essere riconducibili a due grosse categorie:

- Esami aspecifici: hanno l'utilità di segnalare al clinico segni di sofferenza d'organo o di apparato che possa essere, direttamente o indirettamente, correlata con la leishmaniosi. Essi prevedono la determinazione di parametri ematologici ed ematochimici che consentono di completare il quadro clinico-diagnostico, permettendo una valutazione delle condizioni generali del paziente in senso dinamico, ed un apprezzamento della risposta alla terapia.
- Esami specifici: consentono di diagnosticare la malattia in maniera diretta e comprendono esami parassitologici, che hanno lo scopo di evidenziare il parassita nella sua forma di amastigote in organi e tessuti degli animali ed in coltura; esami sierologici, che identificano gli anticorpi specifici nel siero del sangue dei soggetti in esame; esami di diagnostica molecolare che evidenziano porzioni del genoma del parassita.



4.1 ESAMI DI LABORATORIO ASPECIFICI

4.1.1 Proteine totali ed elettroforesi del siero

Nell'approccio diagnostico alla leishmaniosi un'importante strumento di indagine è rappresentato dalla misurazione quantitativa e qualitativa della protidemia: dosaggio della protidemia totale (PT), rapporto albumina/globulina (A/G) ed elettroforesi delle proteine sieriche (protidogramma). Nei cani malati la protidemia totale aumenta e ciò è legato essenzialmente ad una diminuzione dell'albumina e ad un aumento delle β e γ -globuline (talvolta anche delle α 2-globuline), con una conseguente variazione del rapporto A/G che risulta, quindi, inferiore alla norma (Reis *et al.*, 2006). L'ipoalbuminemia è conseguente alla nefropatia, all'enteropatia proteino-disperdente, ai processi flogistici ed alla diminuita sintesi epatica che accompagnano e spesso caratterizzano il corteo sintomatologico della leishmaniosi. L'iper- β -globulinemia è legata alla migrazione in questa banda elettroforetica di alcune immunoglobuline (IgM, IgA), del fattore C3 del complemento, del fibrinogeno e della transferrina. L'iper- γ -globulinemia che si sviluppa nel corso della malattia è il frutto dell'attivazione policlonale dei linfociti B, che producono quantità abnormi di immunoglobuline per lo più aspecifiche. La fusione delle β e γ -globuline in un picco policlonale indica una produzione eterogenea di immunoglobuline aspecifiche (Figura 12).

In presenza di riacutizzazioni della malattia, o di forme acute di processi flogistici concomitanti, può essere presente un innalzamento delle α -2-globuline, banda elettroforetica in cui migrano le così dette "proteine della fase acuta della flogosi" (aptoglobulina, α -2-macroglobulina, ceruloplasmina). Quest'ultime proteine si sono rilevate di grande valore prognostico nella diagnosi della malattia, in quanto in cani positivi, il loro livello risulta sempre più elevato rispetto ai soggetti non infetti. Inoltre, la concentrazione della proteina C-reattiva è significativamente più alta nei cani sintomatici rispetto a quelli asintomatici. Questi dati, indubbiamente utili, non devono essere sopravvalutati in quanto esistono diverse altre condizioni che possono determinare un incremento dei livelli delle proteine



della fase acuta (rischio di false positività): le concentrazioni di aptoglobulina e ceruloplasmina aumentano in caso, ad esempio, di traumi chirurgici e di poliartriti, così come la proteina C-reattiva aumenta nella Leptosiroosi, nella Tripanosmiasi, nelle enteriti batteriche ed emorragiche, nella Parvoviroosi, nell'Ehrlichiosi ed in seguito ad interventi chirurgici. Tutte e tre le proteine, inoltre, possono subire incrementi anche durante i trattamenti corticosteroidi (Martinez-Subiela *et al.*, 2002).

Un alto picco delle α_2 -globuline, inoltre, può anche conseguire ad un interessamento renale (nefrite o nefrosi). La persistenza dell'iper- α_2 -globulinemia dopo trattamento, o la sua ricomparsa in caso di recidive, testimonia l'esistenza di una guarigione clinica particolarmente instabile.

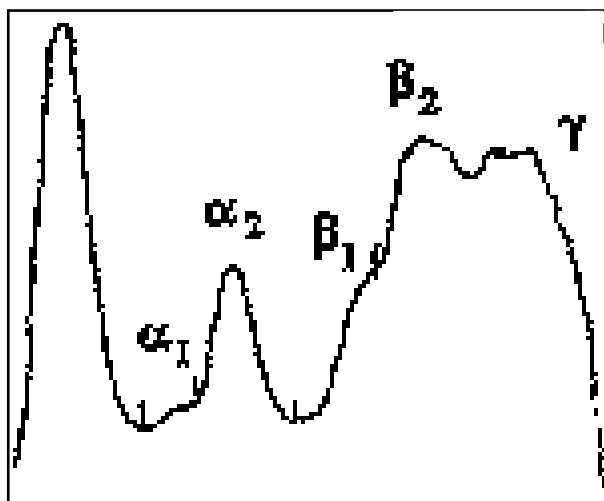


Figura 12. Alterazioni del quadro elettroforetico in corso di infezione recente da leishmaniosi.



4.1.2 Esame emocromocitometrico

L'anemia è una dei reperti clinici più frequenti nei soggetti affetti da leishmaniosi. Il più delle volte l'anemia è di tipo normocitico-normocromico e scarsamente rigenerativa (ipoplasia midollare). La patogenesi dell'anemia è piuttosto complessa e, molto verosimilmente, multifattoriale. I fenomeni immunomediati e/o autoimmuni sembrano giocare un ruolo di particolare rilievo, sebbene siano state avanzate nuove ipotesi patogenetiche (Agu *et al.*, 1982). In alcuni studi è stato chiamato in causa il possibile ruolo dei radicali liberi dell'ossigeno, che, prodotti in grandi quantità anche dai fagociti circolanti, provocherebbero alterazioni della membrana plasmatica degli eritrociti, favorendone la demolizione da parte del sistema reticolo-istocitario (Biswas *et al.*, 1992). Lo stato anemico può essere accompagnato da piastrinopenia, dovuta verosimilmente all'azione di auto-anticorpi anti-piastrine.

A differenza di quanto avviene nell'uomo, nel cane leishmaniotico non è presente leucopenia, bensì leucocitosi neutrofila per le infezioni secondarie cutanee, renali e di altri organi.

4.1.3 Velocità di eritro-sedimentazione (VES)

Questo test è molto generico e si basa sulla misurazione del tempo che impiegano gli eritrociti nel sedimentare in un campione di sangue prelevato con anticoagulante. La VES, nei cani affetti da leishmaniosi, è in costante aumento a causa di vari fattori, quali l'anemia, l'aumento delle γ -globuline e del fibrinogeno, la presenza di Ig e la riduzione della quota albuminica; tutti fattori che contribuiscono all'aggregazione e alla formazione di rouleaux dei globuli rossi, con dimensioni e peso superiore alle singole emazie, e per questo con velocità maggiore di precipitazione nel plasma.

4.1.4 Enzimi epatospecifici

Il coinvolgimento epatico negli animali affetti da leishmaniosi non riveste la stessa importanza di quello renale, sebbene, in alcuni casi, il fegato rappresenti comunque un organo bersaglio, in quanto provvisto di cellule del sistema reticolo-endoteliale.



I danni parenchimali sono rappresentati dall'aumento nel circolo ematico degli enzimi transaminasi glutammico piruvica (ALT) e/o fosfatasi alcalina (ALP) che, dopo adeguata terapia, tendono a normalizzarsi.

4.1.5 Urea e creatinina

Uno degli organi maggiormente coinvolti in corso di leishmaniosi, talvolta l'unico, è senza dubbio il rene. Pertanto il dosaggio sierico dell'urea e della creatinina, insieme all'esame delle urine ed al protidogramma, può fornire utili informazioni sul grado di compromissione renale, oltre ad avere un indiscutibile valore prognostico.

4.1.6 Esame delle urine

La principale alterazione che si evidenzia all'esame delle urine di cani leishmaniotici con lesioni renali è la proteinuria. I test semiquantitativi impiegati nelle ricerche di screening per rilevare la presenza di proteine nelle urine sono molto sensibili, ma sono influenzati dalla concentrazione e dal volume delle urine stesse. Per questo motivo è diventato routinario l'utilizzo del rapporto proteinuria/creatinuria (Urine P/C) per rilevare e quantificare i casi di proteinuria significativa nei campioni di urina raccolti secondo il criterio della casualità. IL rapporto U P/C dei singoli campioni di urina prelevati casualmente, risulta correlato in modo eccellente con il contenuto proteico dei campioni di urine nell'arco di 24 ore da cani normali o colpiti da disfunzioni glomerulari (Grauer *et al.*, 1985).

Sulla base dell'estrapolazione dei dati relativi alle proteine escrete dai cani sani e da studi in cui la valutazione del rapporto U P/C è contemporanea alla biopsia e valutazione istologica del danno renale, sono stati stabiliti i seguenti criteri:

< 0,5	NORMALE
0,5 ~ 1	DUBBIO
> 1	PATOLOGICO



La proteinuria è un segno precoce di glomerulopatia, potendosi rilevare prima dell'innalzamento dei valori della creatinina e dell'urea, ed è anche proporzionale al danno renale, associato o meno alle alterazioni dell'esame del sedimento urinario.

La tipizzazione delle proteinurie è effettuata mediante metodiche di frazionamento delle proteine con SDS-PAGE e SDS-AGE che consentono di differenziare le proteine in base al loro peso molecolare. L'escrezione di proteine ad alto peso molecolare (60.000-70.000 d) è correlata ad un danno prevalentemente glomerulare, mentre il rilievo di proteine a basso peso molecolare è espressione di compromissione tubulare.

In corso di leishmaniosi canina, se il danno renale è grave la proteinuria è di tipo misto (glomerulare e tubulare); se la compromissione renale è meno significativa, la proteinuria è di tipo selettivo (più frequentemente glomerulare).

4.2 ESAMI DI LABORATORIO SPECIFICI

Gli esami specifici utili a diagnosticare la malattia in soggetti sospetti di essere affetti da leishmaniosi, possono essere, a loro volta, suddivisi in due categorie in base al tipo di indagine che viene effettuata. Nel caso in cui lo scopo sia quello di individuare e tipizzare il parassita si parla di metodi diretti, che si differenziano dalle tecniche indirette finalizzate, di contro, a valutare la risposta immunitaria degli animali infetti. A questi si aggiungono altri test, di più recente introduzione, come la diagnostica molecolare (PCR).

4.2.1 METODI DIRETTI

4.2.1.1 Esami parassitologici

Hanno lo scopo di mettere in evidenza il parassita (sotto forma di amastigote) in organi e tessuti animali o in coltura. L'identificazione diretta degli amastigoti all'interno del citoplasma dei macrofagi o liberi nel campione, viene eseguita su strisci ottenuti da ago-aspirato linfonodale (in genere linfonodi prescapolari e poplitei), midollare, epatico, splenico, biopsia cutanea, e per impressione diretta o raschiamento di ulcere e granulomi



(Gomes *et al.*, 2006). Per il prelievo del midollo, la sterno-mielocentesi è senza dubbio la tecnica che offre i maggiori vantaggi, per lo spessore più limitato della corticale ossea delle sternebre. Prelievi bioptici possono altresì essere effettuati a livello cutaneo, asportando una piccola porzione di cute prelevata nello spessore del derma, per poi effettuare diverse impressioni del campione ottenuto su un vetrino portaoggetti. Gli strisci del materiale bioptico possono essere colorati con il May-Grumvald-Giemsa che permette un'agevole evidenziazione degli amastigoti, ma anche con altre tecniche quali la colorazione di Wright e la colorazione di Leishman.

La maggior parte degli Autori ritiene che vi sia una correlazione diretta tra la gravità del quadro clinico ed il numero di parassiti che si rinviene nello striscio. Recentemente, Barrouin-Melo *et al.* (2004), hanno effettuato uno studio sulla comparazione tra l'efficacia del metodo parassitologico a partire da aspirati splenici e linfonodali nell'infezione da *L. infantum* nel cane, suggerendo che l'uso dell'aspirato splenico al posto del linfonodo rappresenta il metodo di elezione per la diagnosi parassitologica. Tuttavia, il nostro gruppo di lavoro ritiene ingiustificato il prelievo splenico data l'invasività della tecnica, ed in considerazione del fatto che nell'esame parassitologico la percentuale dei falsi negativi è particolarmente elevata. Anche Gomes *et al.* (2006), ritengono questa metodica relativamente sensibile e quindi di scarsa utilità nelle ricerche di massa.

Dalle stesse sedi utilizzate per i prelievi suddetti, possono essere effettuati prelievi per l'esame colturale che viene eseguito tramite la semina del campione su un substrato colturale adatto allo sviluppo delle *Leishmanie*, generalmente terreno di Tobie modificato da Evans, o inoculazione in animali da laboratorio (per lo più criceto) (Herwaldt, 1999). La crescita dei promastigoti avviene al massimo entro 30 giorni.

Il rilievo di amastigoti nel sangue periferico, anche se possibile, è un'evenienza molto rara sia nell'uomo che nel cane, ed interessa eventualmente fasi precoci d'infezione.

I metodi immunoistochimici possono essere usati come mezzo supplementare per confermare la diagnosi basata su sezioni colorate con l'ematossilina eosina, in particolar modo in quegli organi che non hanno un'



alta carica parassitaria (Hofman *et al.*, 2003). Questi metodi sono invasivi, richiedono una lunga procedura di preparazione e risultati inappropriati per un'indagine epidemiologica. Liarte *et al.* (2001), hanno effettuato uno studio sull'uso del Buffy Coat Quantitativo (QBC) per diagnosticare l'infezione da *L. chagasi* nell'uomo e nel cane a partire da campioni di midollo osseo e sangue periferico, dimostrando nella loro prova una sensibilità del test pari al 97%.

4.2.2 METODI INDIRETTI

4.2.2.1 Esami sierologici

Sono i test maggiormente utilizzati per la diagnosi ed il controllo della leishmaniosi canina. Si basano sull'identificazione degli anticorpi specifici anti-*Leishmania* circolanti. Questi metodi sono altamente sensibili e specifici, ma non possono essere utilizzati come unico test diagnostico, poiché possono risultare falsamente positivi in quei cani resistenti o sani che sono venuti a contatto precedentemente con il parassita, e falsamente negativi in soggetti che, infettati di recente, non hanno ancora prodotto una risposta anticorpale rilevabile (Mancianti *et al.*, 1988). Risultati falsi positivi possono essere conseguenza di una cross-reattività in quei cani affetti da leishmaniosi cutanea, Malattia di Chagas, Ehrlichiosi, Rickettiosi, Toxoplasmosi. Per contro, l'uso di antigeni di promastigoti crudi o parzialmente purificati possono condurre a risultati inconsistenti (Gomes *et al.*, 2006).

- IFAT - Immunofluorescenza indiretta. È il test più largamente utilizzato. Esso si basa sull'evidenziazione di anticorpi specifici nel siero del soggetto in esame (Dye *et al.*, 1993). Questo test, pur presentando dei limiti oggettivi, legati alla soggettività della lettura, alla variabilità dell'antigene fissato sui vetrini e alla scarsa affidabilità per i titoli bassi (false positività e false negatività), continua a costituire ancora oggi l'esame più impiegato per la diagnosi della malattia, oltre ad essere il test di riferimento utilizzato dall'OMS per diagnosticare la leishmaniosi viscerale sia nell'uomo che nel cane.



Tale indagine si esegue facendo reagire il siero del soggetto in esame, opportunamente diluito, con l'antigene di *Leishmania* fissato su vetrini a 37 °C per 30 minuti circa. Dopo lavaggio ed eliminazione degli anticorpi superflui, si aggiunge l'antiglobulina specifica coniugata con isotiocianato di fluoresceina. La lettura dei campioni viene effettuata al microscopio a fluorescenza (Figura 13). La risposta viene espressa in titoli anticorpali di diluizione: il valore soglia per il sospetto di uno stato di infezione nel cane è considerato 1:40.

Un animale con leishmaniosi può risultare debolmente positivo nelle fasi iniziali dell'infezione in cui può apparire anche del tutto asintomatico, o in forme evolute, in seguito all'instaurarsi di meccanismi di immunosoppressione. Un'altra eventualità di frequente riscontro nella pratica è quella dell'animale trattato con cortisonici o con farmaci specifici (antimoniali) che comportano una drastica riduzione del titolo anticorpale (Mancianti *et al.*, 1990).

Deve essere comunque sottolineato che non c'è una proporzionalità diretta tra titolo sierologico e gravità della malattia, e ancora tra titolo sierologico e tasso di immunoglobuline messe in evidenza dall'esame elettroforetico. La valutazione del titolo anticorpale, come marker nel monitoraggio della terapia, risulta pertanto di scarso significato. Un aiuto in tal senso può derivare non tanto dalla modificazione del titolo sierologico in corso di terapia, quanto dalla sua negativizzazione al termine dei diversi cicli terapeutici e, anche, dalla ricomparsa di sieroconversione, indice precoce di malattia.

Il test ha una specificità del 100% per titoli anticorpali superiori a 1:160, ed una sensibilità che è compresa in un range tra il 98,4% e il 99,5% pur potendosi riscontrare un 5-6% di falsi negativi. Si può quindi affermare che un riscontro sierologico positivo a titolo superiore o uguale a 1:160 indica sempre infezione in atto, mentre titoli compresi fra 1:40 e 1:80, in assenza di sintomi, devono essere considerati dubbi e sarebbe in tal caso opportuno eseguire controlli a medio termine o ricorrere ad indagini diagnostiche più sensibili.

Nonostante la metodica IFAT sia stata per decenni una tecnica fondamentale



routinaria per la diagnosi di leishmaniosi canina, essa è associata a numerose problematiche, sia legate alla metodica che all'interpretazione clinica dei risultati ottenuti. Si deve ricordare infatti che la ricerca di anticorpi mediante le metodiche di immunofluorescenza è una prova semiquantitativa, fortemente legata alla qualità dei reagenti impiegati, all'esperienza e capacità degli operatori. Inoltre, in mancanza di linee guida obbligatorie, ogni laboratorio ha facoltà di eseguire la prova (e di refertarla) con procedure "personalizzate".

La mancanza di standardizzazione della prova si riflette in modo evidente, ad esempio, nella scelta del cut-off, ovvero nel titolo soglia oltre il quale il paziente viene considerato "positivo". Per alcuni laboratori la soglia è 1:40, per altri 1:80. Accanto a tali valori si utilizzano aggettivi quali "reattivo", oppure si producono referti con un titolo 1:160, preceduto dal segno matematico \pm , implicitamente a riconoscere l'indeterminatezza del risultato. Il test, quindi, è da utilizzare come punto di partenza per l'approccio clinico al singolo paziente; ed inoltre il titolo non può essere utilizzato nel monitoraggio della malattia, perché qualsiasi terapia si associa ad una riduzione del titolo, a prescindere dalla reale "guarigione" e dal rischio di recidiva (Koutinas *et al.*, 2001).

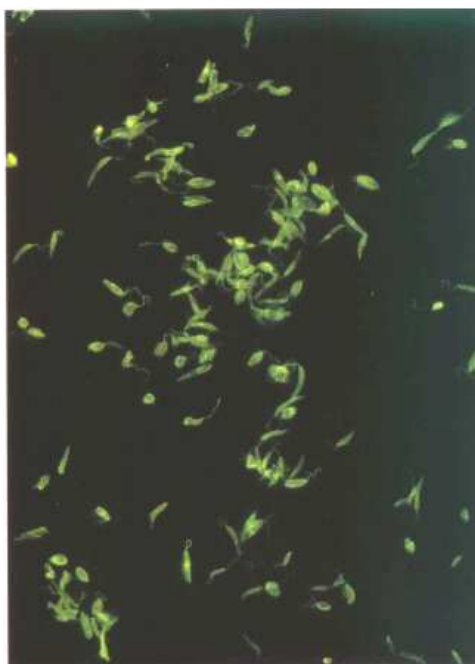


Figura 13. IFAT di forme di promastigoti di *Leishmania infantum*.



- ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Si tratta di un test immunoenzimatico che utilizza antigeni solubili adsorbiti su piastre. La formazione del complesso antigene-anticorpo viene evidenziata mediante l'aggiunta di una antiglobulina di cane coniugata con un enzima che, in caso di positività, rivela una reazione colorimetrica che viene letta da uno spettrofotometro. Poiché l'antigene è rappresentato da un estratto proteico crudo di parassiti in coltura, costituito dall'insieme di tutti gli antigeni proteici del parassita, l'affidabilità del test immunoenzimatico non è alta, a causa delle possibili risposte aspecifiche. Al fine di ottimizzare la metodica, si è ricorsi anche all'impiego dell'ingegneria molecolare per creare un antigene ricombinante a sostituzione dell'antigene crudo, denominato K39, da tempo utilizzato per la sierodiagnosi della leishmaniosi viscerale umana (Gomes *et al.*, 2006).

Sovrapponibile alla tecnica ELISA, è quella della DOT ELISA, che utilizza promastigoti interi fissati su un supporto in nitrocellulosa e collocati sul fondo di micropiastre: la reazione si svolge come una normale ELISA, ma per la lettura non è necessario lo spettrofotometro. I vantaggi rispetto all'ELISA tradizionale sono numerosi: essa è più rapida, richiede minori quantità di antigene e la lettura non è influenzata da sieri emolitici o lipemici.

Per superare i problemi suddetti, alcuni gruppi di ricercatori hanno valutato l'uso di anticorpi monoclonali (Mabs) per la diagnosi della leishmaniosi viscerale. Jaffe and McMahon-Pratt (1987), hanno messo a punto un'ELISA competitiva, usando tre Mabs prodotti contro la *L. donovani* (D2, D13 e D14), in pazienti affetti da leishmaniosi viscerale, mostrando una sensibilità ed una specificità del test rispettivamente del 90% e del 100%. Sebbene i Mabs siano diretti contro epitopi specifici, non sono escluse le cross-reazioni.

Un'ulteriore tecnica sierodiagnostica affidabile, ma di scarsa praticità per screening di massa, è quella del Western Blot. Riera *et al.* (2004), hanno dimostrato un'elevata sensibilità dell'analisi di Western blot in quei soggetti caratterizzati da bassi titoli anticorpali sierici, quando il parassita intero viene utilizzato come antigene. Recentemente, è stato messo a punto un saggio di Western Blot Quantitativo Computerizzato in casi di infezione



sperimentale da *L. infantum*, allo scopo di migliorare la diagnosi e la prognosi della leishmaniosi viscerale canina (Gomes *et al.*, 2006).

4.2.2.2 Diagnostica molecolare

Tra le prove diagnostiche microbiologiche più recentemente messe a punto, quelle molecolari sono senza dubbio tra le più promettenti (Roura *et al.*, 1999). Le sonde molecolari e la “polymerase chain reaction”(PCR) permettono, infatti, il ritrovamento di un numero estremamente esiguo di microrganismi o di frammenti del loro materiale genetico, e l'identificazione di tratti genomici specifici di un determinato microrganismo.

Le sonde molecolari vengono utilizzate per l'ibridazione del genoma di un microrganismo in campioni biologici fissati su vetrino. La PCR qualitativa permette, invece, l'amplificazione logaritmica in vitro del DNA-target che identifica il microrganismo in esame, attraverso l'uso di “primer” specifici che legandosi a tratti del genoma, ne permettono la duplicazione e l'amplificazione.

La PCR qualitativa è stata testata con successo su diversi campioni biologici di cani, uomini ed anche volpi affetti da leishmaniosi (sangue, linfonodi, cute, midollo, urine, tamponi congiuntivali), mostrandosi altamente specifica ma non altrettanto sensibile (Gomes *et al.*, 2006). Il limite della tecnica è rappresentato dalla possibile contaminazione del campione che può dare origine a falsi positivi, e dal fatto che il test possa risultare positivo anche in seguito ad ipotetica sterilizzazione post- terapia.

La PCR qualitativa manifesta una specificità, sensibilità ed affidabilità maggiore rispetto all'osservazione diretta (strisci e colture) ed alla sierologia, rendendola il metodo gold standard nella diagnosi dell'infezione da *Leishmania* sia negli uomini che nel cane (Gomes *et al.*, 2006).

In genere la PCR qualitativa rileva, in maniera più attendibile e con maggiore precisione di altri metodi diagnostici, gli stadi precoci della malattia, e quindi anche i casi transitori ed autolimitanti dei quei soggetti che in qualche modo risolvono l'infezione (Gradoni, 2002).



Oltre che come mezzo diagnostico, la PCR qualitativa può essere utilizzata anche per monitorare il decorso della malattia durante e dopo il trattamento antiparassitario, e per classificare le diverse specie di *Leishmania*, mediante l'utilizzo di primers specie-specifici (Roura, 2001).

A fronte di questi indubbi vantaggi, a tale tecnica sono associati dei limiti che devono, comunque, essere messi in evidenza, dal momento che essa non permette di distinguere un parassita “vivo” da uno “morto” e richiede un personale più che qualificato, al fine di evitare le contaminazioni crociate responsabili di risultati falsamente positivi (Moreira *et al.*, 2004).

4.2.2.3 Real-Time PCR

La tecnica della PCR qualitativa, pur essendo molto specifica, non consente la quantificazione del DNA bersaglio di partenza, per cui può essere di limitata utilità quando si richiede un accurato monitoraggio dell'agente patogeno in questione. Per superare queste limitazioni, recentemente sono state realizzate tecniche di PCR quantitativa (real-time PCR), che permettono la misurazione della carica di agenti patogeni in pazienti affetti da malattie infettive, il monitoraggio del trattamento e la discriminazione fra pazienti rispondenti e non rispondenti alla terapia (Colucci, 2000).

La real-time PCR permette il monitoraggio del prodotto di amplificazione ciclo per ciclo (in “tempo reale”); in questo modo è possibile determinare a quale ciclo il prodotto comincia ad amplificarsi in maniera esponenziale, il cosiddetto “ciclo soglia”. Per inferenza, è possibile quantificare in termini relativi il DNA stampo presente all'inizio della reazione con precisione e riproducibilità (Gomes *et al.*, 2006). Da tale quantificazione deriva una stima della carica parassitaria relativa nei diversi campioni presi in esame. La quantificazione assoluta viene ottenuta in riferimento ad uno standard interno amplificato simultaneamente al DNA campione, o ad uno standard esterno ricavato mediante amplificazione di diverse concentrazioni note di un campione di riferimento in reazioni parallele.

Per il monitoraggio della formazione del prodotto bersaglio durante l'amplificazione esistono varie metodiche che prevedono, generalmente, l'uso di particolari sonde fluorescenti, come le tecnologie SYBR Green® e



TaqMan®.

La fluorescenza che si genera durante la PCR per effetto delle diverse reazioni chimiche, basate sia sul legame di coloranti fluorescenti che si intercalano nella doppia elica di DNA, sia sull'ibridazione di sonde specifiche, viene quindi misurata in tempo reale da una telecamera CCD. Tutti le operazioni relative alle misurazioni avvengono sotto il controllo di un software gestito da un personal computer.

I vantaggi della metodica di real-time PCR, rispetto alle tecniche di PCR standard, consistono nella rapidità della produzione dei risultati, nell'eliminazione delle manipolazioni post-amplificazione per la rilevazione degli amplificati (con riduzione dei tempi e dei rischi di contaminazione), e nell'aumento della sensibilità (Gomes *et al.*, 2006). È ipotizzabile, inoltre, che la quantificazione della carica residua parassitaria in corso di terapia possa essere usato come metodo di controllo dell'efficacia della stessa ed, eventualmente, di predizione delle recidive dopo la sospensione del trattamento, oltre che come strumento in supporto alla valutazione della necessità di effettuare un trattamento preventivo in soggetti infetti asintomatici, come suggerito da ricerche comparse in letteratura a proposito di patologie virali (Griscelli *et al.*, 2001).

La real-time PCR può anche essere usata per l'identificazione e la diagnosi di microrganismi appartenenti allo stesso genere, permettendo la differenziazione di specie o ceppi di importanti microrganismi patogeni mediante l'analisi delle curve di melting dei prodotti fluorescenti di PCR. Così, la *L. major* può essere differenziata dalla *L. donovani*, dalla *L. tropica* e dalla *L. infantum*, a seconda delle temperature di melting, che dipendono dalla percentuale di GC/AT, dalla lunghezza e dalle sequenze nucleotidiche dei prodotti amplificati. Tale aspetto della metodica di real-time PCR rappresenta una rapida alternativa per l'identificazione delle specie in diagnostica e negli studi epidemiologici della leishmaniosi o di altre parassitosi asintomatiche (Gomes *et al.*, 2006).



5. TERAPIA

Il trattamento della leishmaniosi canina è ancora una questione aperta in quanto non esistono, a tutt'oggi, farmaci responsabili di una guarigione parassitologica e protocolli standardizzati per la cura dei soggetti infetti. Il raggiungimento di una sterilizzazione parassitologica è al momento il principale obiettivo di molti studi sia in campo umano che veterinario, poiché i cani sono i principali serbatoi per la trasmissione della leishmania viscerale all'uomo.

I farmaci comunemente usati per la terapia anti-*Leishmania* in medicina veterinaria sono gli stessi utilizzati per la leishmaniosi umana, con modalità e posologia differenti (Alvar *et al.*, 2006). Mentre in campo umano, però, la terapia porta ad una percentuale di guarigione completa di circa il 96% dei casi, negli animali purtroppo tale percentuale scende drasticamente. Spesso si tende a confondere la guarigione clinica (regressione di tutti i sintomi) con la guarigione completa (negativizzazione dei test sierologici e scomparsa del parassita), considerata evento rarissimo. Frequenti sono infatti le recidive della malattia in forme spesso più gravi e refrattarie ai trattamenti.

Se la malattia viene diagnosticata precocemente, quando ancora non sussiste una sintomatologia conclamata ed il soggetto è giovane, con una cura appropriata, si può raggiungere una percentuale di guarigione anche del 40%. Con l'avanzare dell'età, ma soprattutto nelle forme avanzate, la percentuale scende intorno al 5-15%.

Occorre distinguere una terapia specifica, diretta contro il parassita, ed una sintomatica e di supporto, richiesta dallo stato clinico in presenza di complicanze. I protocolli terapeutici più frequentemente utilizzati in Italia sono quelli che prevedono l'impiego dell'antimoniato di N-metilglucamina (Glucantime®), in combinazione con l'allopurinolo o con l'amminosidina, con dosaggi e tempi di somministrazione molto variabili. Altri farmaci utilizzati nel corso degli anni sono la pentamidina, il metronidazolo e la spiramicina.



I fluorochinoloni, in particolare l'enrofloxacin, sono potenzialmente utilizzabili in associazione a chemioterapici specifici anti-*Leishmania*, in virtù di un loro effetto immunomodulante.

Uno dei farmaci più recenti utilizzati per la terapia della leishmaniosi viscerale dell'uomo è l'amfotericina B inclusa nei lisosomi (AmBisome), che è stato dimostrato essere un potente agente anti-*Leishmania* nel topo ma anche nell'uomo. In Italia, l'AmBisome è considerato il farmaco elettivo per il trattamento della leishmaniosi umana. Nel cane invece questo farmaco induce una rapida guarigione clinica ma non è efficace nell'eliminare i parassiti, ed è opinione generale che farmaci contenenti questo agente non dovrebbero essere utilizzati in veterinaria per evitare la selezione di parassiti resistenti.

Ad oggi tutte le ricerche sono rivolte allo studio e all'applicazione dell'immunoterapia.

5.1 COMPOSTI ANTIMONIALI

La meglumina antimonio (combinazione di antimonio pentavalente e N-metilD-glucamina) e lo stibogluconato di sodio (farmaco non disponibile in Italia), sono due composti di antimonio (Sb) pentavalente che sono stati introdotti per la prima volta per la cura della leishmaniosi umana nel 1940, e a tutt'oggi sono considerati farmaci di prima scelta nel trattamento della leishmaniosi canina.

Presentano efficacia e tossicità analoghe: lo stibogluconato è il solo antimoniale disponibile negli USA e nei Paesi anglofoni (Africa e India in particolare), mentre la meglumina è maggiormente utilizzata nei Paesi francofoni, in America centrale e meridionale. Il meccanismo d'azione dei composti antimoniali non è ancora perfettamente conosciuto: si ipotizza che essi si concentrano nelle cellule del sistema reticolo-endoteliale (SRE) in cui sono fagocitate le *Leishmanie*, ed interferiscono con il metabolismo del parassita mediante un'azione di inibizione selettiva di alcuni importanti enzimi della glicolisi e della β -ossidazione degli acidi grassi (fosfofrutto-chinasi e deidrogenasi piruvica) localizzati nei glicosomi, con conseguente riduzione della produzione di ATP e di GPT.



Un'altra possibile azione si ha a carico della permeabilità e del trasporto di membrana delle cellule del parassita.

In Italia l'unico farmaco disponibile è l'Antimoniato di N-metilglucamina, con il nome commerciale di Glucantime® (Rhone-Poulenc-Rorer). È presente anche una forma di Antimoniato di N-Metilglucamina incapsulato all'interno di liposomi che presenta una maggiore concentrazione di Sb nel plasma, un maggior volume di distribuzione ed una eliminazione più lenta. Tuttavia il confronto tra il costo-beneficio della terapia di tipo convenzionale (Antimoniato di meglumina) e di quella a base di questo farmaco è ancora elemento di dibattito nella comunità scientifica (Baneth and Shaw, 2002).

Il destino farmacocinetico dei composti antimoniali è pressoché sovrapponibile nell'uomo e nel cane: in entrambe le specie, infatti, la concentrazione degli antimoniali nel sangue è ben descritta da un modello a tre compartimenti, con una corta fase iniziale di distribuzione seguita da un'eliminazione biesponenziale, realizzata principalmente per via renale. L'emivita media si è rivelata compresa tra 1,7 e 33 ore dopo la somministrazione endovenosa, e tra 2 e 76 ore dopo l'iniezione intramuscolare. La fase finale di eliminazione lenta può essere dovuta alla conversione dell'antimonio da pentavalente a trivalente; quest'ultimo può essere poi responsabile della tossicità osservata soprattutto in corso di trattamenti ad alte dosi e di breve durata.

In medicina umana l'efficacia dei composti antimoniali varia in base al quadro sindromico della leishmaniosi (viscerale, mucosa e cutaneo-mucosa), ed alla specie di *Leishmania* coinvolta. Negli ultimi decenni, si sta assistendo sempre più di frequente alla comparsa di insuccessi terapeutici, in percentuali variabili tra il 5 e il 70% in alcune aree endemiche, a causa principalmente della selezione di ceppi del parassita resistenti sotto la pressione di dosaggi sub-terapeutici dei farmaci stessi. Uno dei focolai di resistenza è stato individuato in aree a nord del fiume Gange, in Bihar ed in Nepal ([Figura 14](#)) (Alvat *et al.*, 2006).

Occorre ricordare che i composti antimoniali, analogamente agli altri farmaci utilizzati nelle terapie anti-*Leishmania*, non sono in grado di



garantire la negativizzazione parassitologica degli animali ammalati, se non per brevi periodi di tempo, e, pertanto, sono molto frequenti i casi di recidive (Mancianti and Bizzeti, 2000).

Anche negli uomini sono particolarmente comuni le ricadute, e soprattutto nelle persone ammalate di AIDS; ciò sta ad indicare che il sistema immunitario stesso dell'uomo riveste un ruolo fondamentale nella risposta clinica al trattamento. In alcuni casi di leishmaniosi viscerale resistente ai soli antimoniali e di leishmaniosi cutanea diffusa, si è rivelata utile la loro associazione con IFN- γ ricombinante (Alvar *et al.*, 2006).

I farmaci antimoniali possono essere somministrati per via endomuscolare, sottocutanea ed endovenosa. Gli effetti collaterali sono di vario tipo ed interessano diversi distretti organici come il cuore, il rene, il fegato; più raramente possono verificarsi alterazioni del profilo ematologico, rappresentati da leucopenia, grave agranulocitosi ed anemia emolitica. Spesso, però, diventa difficile distinguere gli effetti collaterali dei farmaci antimoniali dai sintomi legati al progredire della malattia. Nell'uomo oltre che i classici effetti collaterali (nausea, vomito, dolori addominali, malessere generalizzato, cefalea, innalzamento delle transaminasi, nefrotossicità, artromialgie, febbre, esantema cutaneo), si sono verificati quadri di pancreatite acuta (in particolare nei soggetti HIV-positivi), e alterazioni elettrocardiografiche correlate al dosaggio del farmaco; le più frequenti sono rappresentate da alterazioni aspecifiche del tratto S-T, dall'allungamento dell'intervallo Q-T e, più raramente, da aritmie atriali e ventricolari. Le morti improvvise osservate sono state associate a dosaggi maggiori di quelli raccomandati (Gradoni, 2001a).

Nel cane il protocollo terapeutico più seguito prevede un dosaggio di 100 mg/kg di metilglucamina frazionato in due somministrazioni giornaliere, somministrato per via sottocutanea per un periodo di 30 giorni consecutivi, da solo o in associazione ad altri composti (allopurinolo, amminosidina) (Miranda *et al.*, 2007).

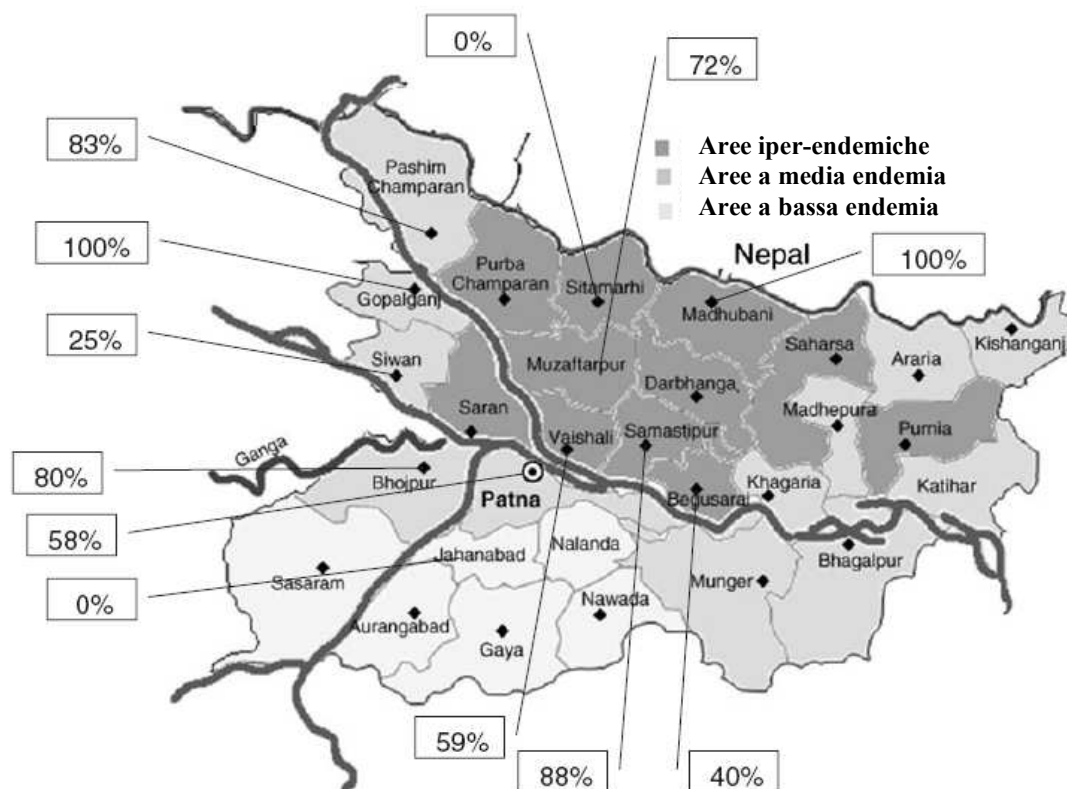


Figura 14. Distribuzione della resistenza della leishmaniosi viscerale agli antimoniali in Bihar e Nepal (Alvar *et al.*, 2006).



5.2 ALLOPURINOLO

L'allopurinolo è un composto analogo dell'ipoxantina, largamente impiegato nella terapia della gotta dell'uomo per la sua azione di blocco della xantino-ossidasi nella sintesi dell'acido urico. La sua attività anti-*Leishmania* è dovuta al fatto che la *Leishmania* è incapace di sintetizzare autonomamente le purine, e deve necessariamente recuperare le basi azotate e i nucleosidi dall'ospite. Esso, quindi, viene metabolizzato e trasformato dagli organismi del genere *Leishmania* in un analogo inattivo dell'inosina, nucleoside formato dall'unione di una molecola di ribosio con una di ipoxantina. Quando questo analogo viene utilizzato dall'RNA del patogeno, la traduzione delle proteine che ne deriva è alterata con conseguenti effetti negativi sull'intero metabolismo del parassita (Baneth *et al.*, 2002). Questo farmaco, comunque, nei confronti della *Leishmania* non ha azione parassitocida, ma solo parassitostatica.

Nei tessuti dei mammiferi, al contrario, solo il 10% di allopurinolo viene convertito nell'analogo dell'inosina (il restante 90% è trasformato in ossipurinolo, composto totalmente inattivo), che non subisce nessuna conversione citotossica successiva. Per tale motivo, l'allopurinolo è considerato pressoché privo di effetti collaterali e comunque, quelli che si possono manifestare non attentano alla vita del soggetto in cura. È raccomandato monitorare le funzioni epatiche e renali soprattutto dei pazienti di vecchia data, in quanto si possono verificare problemi di xantinuria e formazione di uroliti xantini, specialmente in cani con alterazioni delle funzionalità epatiche (Ling *et al.*, 1991).

L'allopurinolo è comunemente impiegato per la terapia della leishmaniosi sia da solo che in combinazione con antimoniali pentavalenti, in quanto previene le ricadute grazie al suo effetto parassitostatico.

Noli and Auxilia (2005), hanno dimostrato che la terapia effettuata con il solo allopurinolo non è sufficiente a ridurre in maniera significativa i titoli anticorpali anti-*Leishmania*, mentre l'uso di allopurinolo, in associazione ad una terapia a base di antimonio di meglumina, è fondamentale per migliorare l'efficacia clinica del trattamento e ridurre il tasso di recidiva.



Ricorrere ad una combinazione di composti antimoniali e allopurinolo, inoltre, determina una migliore tollerabilità della terapia ed un contenimento dei costi in quanto il sinergismo dei due farmaci consente di ridurre la dose totale dei composti antimoniali che viene impiegata durante tutta la terapia (Denerolle and Bourdoiseau, 1999).

Il protocollo suggerito consiste in un trattamento iniziale con entrambi i farmaci per almeno tre settimane, seguito da un trattamento prolungato con solo allopurinolo, alla dose di 20-40 mg/kg al giorno o a giorni alterni. Nel cane vengono consigliati dosaggi di 10-20 mg/kg due volte al giorno, per os e per periodi variabili da 6 a dodici mesi (Miranda *et al.*, 2007).

5.3 AMINOSIDINA

L'aminosidina (o paromomicina) è un antibiotico aminoglicosidico, prodotto dall'attinomicete *Streptomyces rimosus*, che è dotato di un ampio spettro di attività contro batteri, micoplasmi ed alcuni protozoi. Sperimentalmente ha mostrato di avere una spiccata attività leishmanicida se somministrato per via parenterale in modelli murini di leishmaniosi viscerale e nel cane (Gradoni, 2001a). Il suo meccanismo di azione è identico sia nei confronti dei batteri che della *Leishmania*: riesce ad attraversare la membrana cellulare grazie ad una proteina carrier che si forma nei microrganismi sensibili e raggiunge alte concentrazioni intracellulari, capaci di inibire la sintesi delle proteine interferendo nel legame tra l'aminoacyl transfer RNAs e le subunità ribosomiali 30 S. Ne consegue la produzione di proteine anomale incapaci di assolvere alla loro normale funzione. A questo primo importante meccanismo si aggiunge un'alterazione della permeabilità della membrana cellulare, con perdita di elementi essenziali.

Gli aminoglicosidi sono scarsamente assorbiti per os, venendo quasi completamente eliminati per via fecale. La somministrazione di aminosidina deve essere quindi opportunamente eseguita per via parenterale. Se somministrata per via sottocutanea o intramuscolare rimane in circolo per circa 5 ore e solo una minima parte viene assorbita a livello intestinale, mentre la maggior parte viene escreta quasi esclusivamente per via renale.



Gli effetti collaterali principali si manifestano a livello gastrointestinale e comprendono nausea, vomito, dolori addominali crampiformi e diarrea. Se somministrata per via parenterale, la paromomicina è potenzialmente nefrotossica ed ototossica sull'ottavo paio di nervi cranici (Noli *et al.*, 2005). A dosi elevate ha un'azione curarizzante, e può essere responsabile di reazioni allergiche.

Dagli studi effettuati su questo farmaco emerge che una terapia basata sulla somministrazione di aminosidina alla dose di 5 mg/kg due volte al giorno per 3-4 settimane può portare ad eccellenti miglioramenti clinici nei cani trattati, ma non ha alcun effetto né sul titolo anticorpale, né sul tracciato elettroforetico (Poli *et al.*, 1997).

Di contro, l'uso di aminosidina ad alto dosaggio (20-80 mg/kg die), è fortemente sconsigliato a causa dei forti effetti collaterali che ne derivano (Vexenat *et al.*, 1998).

Negli ultimi anni l'amminosidina ha trovato un discreto impiego nella terapia della leishmaniosi soprattutto in associazione con l'antimoniato di N-metilglucamina, in dose rispettivamente di 5,25 mg/kg ogni 12 ore e di 60 mg/kg bid (Oliva *et al.*, 1998).

5.4 AMFOTERICINA B

Fin dal 1960 è noto che l'amfotericina B, antibiotico macrolide a largo spettro prodotto dall'attinomicete *S. nodosus*, esercita una potente azione leishmanicida. Tale attività si esplica su un target specifico costituito dal gruppo degli ergosteroli, che costituiscono i principali steroli della membrana citoplasmatica sia della *Leishmania* che dei miceti, provocando pori di membrana responsabili della perdita di ioni potassio e magnesio e della successiva morte del parassita. L'amfotericina B mostra però una certa affinità anche per il colesterolo, fondamentale costituente lipidico delle membrane cellulari dei mammiferi e, per questo peculiare meccanismo d'azione, la sostanza non è priva di effetti tossici di una certa importanza, in particolar modo a livello dei nefroni (Randall, 1996).

Di conseguenza, la somministrazione di amfotericina B, richiede un accurato monitoraggio delle funzioni renali durante il trattamento ed occorre



ricorrere a temporanee interruzioni della terapia se il livello della creatinina si eleva sopra i normali valori fisiologici. La ricerca ha però permesso di superare, in parte, il problema della tossicità di questo antibiotico, in quanto sono state messe a punto nuove formulazioni (con il nome di AmBisome®) che prevedono l'incorporazione dell'antibiotico allo stato liofilo all'interno di microsferule di liposomi unilamellari, di diametro inferiore a 100 nm e che hanno dimostrato particolari successi per la terapia delle forme multi-resistenti di leishmaniosi viscerale umana o post-kala-azar. La formulazione liposomiale indirizza in maniera passiva il farmaco verso i tessuti ricchi di macrofagi, ed è associata ad una minore nefrotossicità.

Per la sua bassa tossicità, per la semplicità di esecuzione del trattamento terapeutico e per la riduzione del tempo di ricovero ospedaliero rispetto alla terapia con gli antimoniali, l'AmBisome è diventato il farmaco di elezione nella terapia della leishmaniosi viscerale umana, soprattutto nei bambini, manifestando una percentuale di guarigione del 90% (Sundar, 2001). Inoltre, esso è stato il primo farmaco approvato per il trattamento della leishmaniosi viscerale umana dalla Food and Drug Administration degli Stati Uniti (Gradoni, 2001a).

Gli effetti collaterali ed i costi notevoli ne limitano enormemente l'impiego nelle forme cutanee. Sono in fase sperimentale studi sull'efficacia di questo farmaco per uso topico su cavie animali.

Nel cane, a differenza di quanto avviene nell'uomo, questo farmaco induce una rapida guarigione clinica, ma non è in grado di assicurare la guarigione parassitaria degli animali (Oliva *et al.*, 1995).

Esiste una seconda formulazione lipidica dell'amfotericina B, costituita da una dispersione colloidale in colesterolo (Amphocil), che è stata impiegata per la prima volta nel trattamento della leishmaniosi viscerale umana in Brasile, dimostrando elevata efficacia anche a basso dosaggio, ma con tossicità maggiore rispetto all'AmBisone (Gradoni, 2001a; Sundar *et al.*, 2004).

Nel cane, analogamente all'uomo, dopo somministrazione endovenosa si verifica la distribuzione del farmaco con concentrazioni maggiori a livello del fegato e della milza, dove si è potuta rilevare la sua presenza anche dopo



un anno dall'interruzione della terapia.

Vista l'importanza dell'impiego di questo farmaco in medicina umana, i prodotti contenenti AmBisome non dovrebbero essere utilizzati in medicina veterinaria per evitare la selezione di parassiti resistenti.

5.5 MILTEFOSINE

La miltefosine, sviluppata inizialmente come farmaco antitumorale, è chimicamente un esa-decil-fosfo-colina, cioè un analogo della fosfocolina e come tale in grado di interferire sui segnali metabolici cellulari e sulla permeabilità delle membrane cellulari, nonché sulla loro composizione lipidica. A differenza di altri agenti chemioterapici, la miltefosine non presenta mielotossicità, ed esercita effetti stimolatori sulle cellule progenitrici emopoietiche (Prasad *et al.*, 2004).

La sua efficacia come leishmanicida orale è nota già dalla metà degli anni '80, ma è stata dimostrata sia in vivo che in vitro agli inizi degli anni '90 in diversi modelli sperimentali. Solo recentemente sono stati condotti studi clinici controllati sull'uomo che hanno permesso alla miltefosine di essere introdotta nel panorama delle terapie anti-*Leishmania* nell'uomo e di rappresentare, ad oggi, il primo trattamento orale per la leishmaniosi viscerale (Gradoni, 2001a). Tali studi sono stati eseguiti, in stretta collaborazione, dal governo indiano, dalla casa farmaceutica Zentaris e dal TDR (Tropical Diseases Research), un programma sponsorizzato dall'United Nations Development Program, la World Bank e la WHO (Bhattacharya *et al.*, 2004).

La sua registrazione come farmaco orale per la leishmaniosi viscerale umana in India è avvenuta nel Marzo del 2002, in seguito a studi che hanno dimostrato una percentuale di guarigione del 95% e del 94% nella fase II e III della sperimentazione, rispettivamente. Più recentemente, nel 2005, è stata registrata in Colombia per la cura della leishmaniosi cutanea (Croft *et al.*, 2006).

Nei pazienti con HIV, la miltefosine è da preferirsi ai trattamenti con Stibogluconato di sodio.



Gli effetti teratogeni di questo farmaco, dimostrati nel ratto, ne sconsigliano l'uso in gravidanza ed in bambini molto piccoli.

Questa forma di terapia sembra molto valida, perché, essendo di nuova introduzione, è ben lontana dall'indurre farmaco-resistenza, a differenza dei farmaci più tradizionali come gli antimoniali, anche se la sua prolungata emivita (150-200 ore) non la può escludere (Sundar and Chatterjee, 2006).

Numerosi studi indicano che il meccanismo d'azione leishmanicida della miltefosine si esercita colpendo la via del metabolismo dei fosfolipidi del parassita, interferendo quindi con le vie di comunicazione cellulare e inibendo la sintesi della membrana cellulare parassitaria (Achterberg and Gercken, 1987; Paris *et al.*, 2004; Prasad *et al.*, 2004). Le modalità di azione del farmaco sono rappresentate dall'inibizione della biosintesi dei recettori del GPI (glicosilfosfatidil-inositolo), molecola chiave per la sopravvivenza intracellulare degli amastigoti di *Leishmania*, e dall'alterazione del segnale di trasduzione agendo sulle fosfolipasi C e proteinchinasi C *Leishmania*-specifiche. Ne consegue la morte per apoptosi della cellula protozoaria (Murray and Delph-Etienne, 2000).

Gli effetti tossici attribuiti alla miltefosine in campo umano sono di solito reversibili e di media intensità e comprendono sintomi di natura gastrointestinale, quali vomito e diarrea, che possono portare a conseguenze più gravi soprattutto in quei pazienti malnutriti e disidratati. Alcuni soggetti hanno presentato epato e nefrotossicità reversibili (Prasad *et al.*, 2004).

Nell'anno 2007 l'azienda farmaceutica Virbac ha immesso in commercio in Italia il primo farmaco per uso veterinario a base di miltefosine.

5.6 METRONIDAZOLO

I 5-nitroimidazoli rappresentano una classe di composti (del gruppo ketoconazolo) dotata di attività antibatterica e antiprotozoaria. L'esatto meccanismo di azione del metronidazolo non è completamente chiarito ma, certamente, la sua attività si esplica sul DNA batterico. Alcune prove sperimentali hanno dimostrato che il composto una volta penetrato nell'organismo sensibile, impedisce l'avvolgimento della doppia elica del DNA batterico mediante l'inibizione della DNA-girasi (responsabile del super-



avvitamento del DNA).

I dati relativi all'azione leishmanicida del metronidazolo sono controversi, ma un recente studio condotto da Pennisi *et al.* (2005) ha dato risultati incoraggianti: nel 57% dei cani trattati con un'associazione metronidazolo + spiramicina (metronidazolo a 25 mg/kg e spiramicina a 150 000 UI/kg somministrata per via orale SID per 13 settimane) (Stomorgyl®) è stato riscontrato un notevole miglioramento clinico, sebbene i risultati della sierologia e della PCR abbiano indicato che l'infezione non sia stata debellata dopo i 90 giorni di cura.

5.7 ENROFLOXACINA

L'enrofloxacin è un Acido Chinolon-Carbossilico e possiede (unitamente ad altri chinoloni) gruppi funzionali altamente specifici per l'attività antibatterica. Inoltre i composti di ultima generazione, tra cui l'enrofloxacin, possiedono strutture specifiche che garantiscono un'attività selettiva contro la cellula bersaglio. Ad esempio, la presenza in posizione 6 di un atomo di fluoro permette di allargare lo spettro di azione antibatterico sia nei confronti dei germi gram-positivi e gram-negativi, che dei *Micoplasmi* e della *Clamidia spp.* Inoltre, l'introduzione di un anello piperazinico in posizione 7 ne aumenta significativamente la penetrazione nei tessuti e nei batteri con conseguente incremento dell'attività; mentre l'introduzione di un atomo di ossigeno in posizione 8 comporta un miglioramento delle attività nei confronti dei batteri gram-positivi e dei microrganismi anaerobi senza interferire con il profilo battericida.

I chinoloni inibiscono l'enzima batterico DNA-girasi (topoisomerasi) che è responsabile del superavvitamento del DNA, che può quindi avvolgersi in un numero di domini cromosomici e fissarsi intorno al nucleo dell'RNA. Perché ciò avvenga anche il cromosoma deve essere momentaneamente inciso prima di fissarsi. Quando la DNA-girasi viene inibita dai chinoloni, si verifica una riduzione del "superavvitamento" con conseguente alterazione dell'orientamento spaziale del DNA. Le incisioni esposte attivano delle esonucleasi che degradano il DNA cromosomico in piccoli frammenti. Anche le topoisomerasi dei mammiferi presentano analoga attività, ma questi



enzimi sono sostanzialmente differenti dalla girasi batterica che non è, quindi, suscettibile di inibizione ad opera dei chinoloni. Una similitudine biochimica a quella batterica è però presente nella struttura genomica di alcuni *Trypanosomi*, e l'attività dei chinoloni potrebbe interferire anche con la replicazione del DNA del parassita.

Per i nuovi composti, in vitro, non vi sono state mai segnalazioni di resistenze mediate da plasmidi ma solo di tipo cromosomico (alterazione del sito di attacco dell'enzima girasi).

Prove sperimentali sulla sua efficacia nella leishmaniosi canina sono molte scarse.

5.8 PENTAMIDINA

La pentamidina è stata aggiunta alla lunga lista dei farmaci anti-*Leishmania* nel 1950 (Alvar *et al.*, 2006). Si tratta di un composto aromatico diamidinico con elevata attività antiprotozoaria ed antifungina, che fino a pochi anni fa era considerato (soprattutto in Francia) il farmaco di elezione nella terapia di alcune forme di leishmaniosi cutanea e muco-cutanea dell'uomo, ma anche di alcune forme di tripanosomiasi. Il suo meccanismo di azione è ancora poco conosciuto, ma di sicuro essa agisce provocando danni al kinetoplasto ed al complesso mitocondriale dei protozoi.

A differenza dei composti antimoniali, la sostanza si accumula per mesi nel fegato e nei reni, attraverso i quali viene eliminata molto lentamente. Al suo uso sono associati molti effetti collaterali sia acuti (ipotensione, tachicardia, vomito, diarrea, shock anafilattico), che cronici (ipoglicemia, diabete, danni epato-renali, trombocitopenia). Inoltre, la pentamidina isetionato, il sale normalmente presente nelle preparazioni commerciali, somministrata per via intramuscolare risulta fortemente istolesiva, tanto da provocare la formazione di ascessi nel punto di inoculazione.

L'uso di pentamidina per il trattamento della leishmaniosi canina è stato investigato in due studi nei quali il farmaco veniva somministrato due volte la settimana ad una dose di 4 mg/kg IM per 4 settimane, seguita da un secondo trattamento ripetuto dopo 3 settimane (Rhalem *et al.*, 1999; Lasri *et al.*, 2003).



In tutti gli animali è stata osservata una quasi totale scomparsa dei segni clinici, senza che si siano verificate recidive nei 6 mesi successivi. Sfortunatamente negli studi sopracitati non è stata riportata l'insorgenza e la gravità degli effetti collaterali che, comunque, potrebbero limitare fortemente l'uso di questo farmaco nella pratica clinica.

5.9 IMMUNOMODULATORI

Con il termine immunomodulatori si fa riferimento ad una gamma di sostanze (in genere proteine) prodotte dallo stesso agente eziologico che si vuole contrastare, sia esso una cellula tumorale o un microrganismo, e che hanno un evidente ruolo nello stimolare una risposta protettiva specifica in soggetti "responder".

Studi recenti hanno evidenziato come la leishmaniosi provochi un forte squilibrio a carattere immunitario nel cane infetto, che si traduce in un deficit della risposta cellulo-mediata (scarsa attivazione dei Th1) ed in una massiva risposta umorale (attivazione policlonale dei linfociti B), nella maggior parte dei casi aspecifica, non protettiva e addirittura dannosa per l'animale (Hondowicz and Scott, 2002; Quinnel *et al.*, 2003).

La ricerca su nuove sostanze ad azione parassitocida, quindi, negli ultimi anni è stata affiancata dallo studio di sostanze in grado di ripristinare e orientare in senso positivo la risposta immunitaria dei cani ammalati. Nel campo della leishmaniosi sono stati già individuati e selezionati alcuni antigeni capaci di evocare in animali di laboratorio e anche nel cane una risposta immunitaria protettiva, o consentire la guarigione di quelli ammalati (Oliva, 2003). Altre strade percorribili sono quelle che prevedono l'impiego di linfocine "positive" (IFN- γ , IL-12), da utilizzare a scopo profilattico o terapeutico.

IFN- γ promuove la penetrazione degli antimoniali pentavalenti nei macrofagi ed induce la produzione di IL-12. L'IFN- γ che si trova in commercio è di origine umana ed è molto costoso; andrebbe somministrato per via orale onde evitare fenomeni di immunizzazione e conseguente inattivazione. Sono stati ottenuti buoni risultati (scomparsa dei segni clinici, negativizzazione sierologica, normalizzazione del protidogramma) tramite la



somministrazione di 100 UI al giorno x 7 gg, e poi a settimane alterne per altri 3 mesi.

Il limite delle sostanze ad azione immunomodulante ad oggi disponibili, è legato alla loro scarsa specificità nei confronti dei delicati equilibri della risposta immunitaria: le complesse interazioni tra le cellule competenti, i sistemi di amplificazione, il controllo genetico della risposta sia umorale che cellulare, e altri meccanismi non ancora del tutto noti, rendono poco selettiva l'azione di questi farmaci.



6. PROFILASSI

Uno dei mezzi più efficaci per prevenire la leishmaniosi viscerale canina è quello di impedire il contatto tra il cane ed il vettore per interrompere il ciclo domestico della malattia. A tal proposito, numerosi studi condotti nell'ultimo decennio hanno dimostrato l'importanza dell'uso nei cani di bande protettive impregnate di insetticidi, come mezzo efficace per prevenire le punture dei flebotomi. Questi collari fungono da repellenti, allontanando ed uccidendo i flebotomi che cercano di pungere i cani. I piretroidi sintetici come la deltametrina e la permetrina, si sono rivelate le migliori sostanze utilizzate in questo senso. Diversi studi condotti sia in Francia che in Brasile, hanno dimostrato che i collari impregnati di deltametrina proteggono i cani dal 96% dei morsi per più di 34 settimane. Studi di campo hanno dimostrato che l'applicazione di massa di collari impregnati di insetticidi sui cani riduce l'incidenza della leishmaniosi canina nelle aree di intervento, svolgendo di conseguenza un'azione preventiva benefica anche sul controllo della malattia negli uomini (Dantas-Torres, 2006). Infatti, da una indagine condotta con il supporto dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (The Lancet, 2002), in un'area nel Nord Ovest dell'Iran, è risultato che l'applicazione di massa di bande a base di deltametrina non solo ha ridotto l'incidenza d'infezione da *L. infantum* nei cani che indossavano il collare, ma anche nei bambini che vivevano nei villaggi dove i cani erano stati protetti (Gavvani *et al.*, 2002).

Travi *et al.*, (2001) hanno recentemente dimostrato che una riduzione della carica parassitaria nei cani serbatoio attraverso la vaccinazione, si associa ad una ridotta infettività dei flebotomi (*L. longipalpis*), comportando riduzione della trasmissione della malattia dal cane all'uomo nelle aree di trasmissione zoonotica.

Ne consegue che la profilassi vaccinale, obiettivo da tempo perseguito sia in medicina umana che veterinaria, risulta il migliore approccio alla lotta alla leishmaniosi canina..

A tutt'oggi, non esistono vaccini totalmente "efficaci", e le difficoltà legate al loro sviluppo sono riconducibili alla notevole variabilità genetica ed



antigenica del microrganismo. A conferma di ciò, basti pensare che ad oggi esiste un solo vaccino in sperimentazione per la leishmaniosi umana (Leish 111f), ancora impegnato nella fase I del processo sperimentale. Per il cane sono invece più numerosi i candidati vaccinali in corso di studio, circa sette dal 2001 al 2005, che si basano sui dati delle fasi sperimentali pre-cliniche effettuate per l'uomo e utilizzano diversi presidi antigenici, quali organismi interi modificati, frazioni purificate, antigeni ricombinanti e DNA.

Dai vari studi immunologici di cui è ricca la letteratura, appare chiaro che la principale prerogativa richiesta ad un vaccino, è l'induzione di una risposta immunitaria cellulo-mediata stabile e duratura. Una ricerca condotta da Stobie *et al.*, (2000), ha dimostrato che lo step necessario per l'innescare di una risposta immunitaria di tipo cellulo-mediata, è rappresentato da una precoce produzione di IL-12 endogena. Di conseguenza, nell'ultimo decennio le ricerche si sono orientate verso l'identificazione di molecole di *Leishmania* capaci di stimolare il fenotipo citochinico tipico del profilo Th1, in modo da poter essere utilizzate come potenziali candidati vaccinali negli animali sperimentali ed in vivo.

I tentativi di sviluppo di un vaccino contro la leishmaniosi si sono concentrati sull'uso di parassiti interi inattivati o di subunità con adiuvanti. Nuove strategie sperimentali riguardano l'attenuazione di *Leishmania* attraverso tecnologie di delezione o l'espressione di specifici peptidi leishmaniotici all'interno di microrganismi attenuati, come BCG. In fase iniziale di sviluppo sono pure i vaccini a DNA ed i potenziatori delle cellule dendritiche, come gli oligo-desossi-nucleotidi CpG ed il ligand Flt-3. In particolare, l'attuale interesse nei confronti dei vaccini a DNA nasce dalla loro notevole stabilità, dalla facilità di manipolazione, e nella loro capacità di innescare una risposta immunitaria cellulo-mediata a dispetto di una umorale, anche quando sono formulati senza adiuvante. I vaccini a DNA, esprimenti antigeni come la proteina gp-63, il LACK, il PSA-2, il TSA e l'STI1, hanno manifestato un'adeguata protezione contro l'infezione da *Leishmania* nei topi (Saldarriaga *et al.*, 2006).

Anche nel modello canino sono state sperimentate diverse strategie vaccinali. In Brasile, dove la leishmaniosi viscerale è endemica sia nell'uomo



che nel cane, da Silva *et al.* (2000) hanno descritto l'effetto protettivo del vaccino costituito dall'antigene glicoproteico FML (fucose mannose ligand) di *L. donovani*, un potente immunogeno nonché uno specifico e sensibile antigene per la diagnosi sierologica della leishmaniosi viscerale canina ed umana. Il vaccino FML è stato sperimentato in modelli di leishmaniosi viscerale nel topo e nel criceto con trial di fase I-II, dove ha manifestato una protezione media specifica pari rispettivamente all'87,7% e all'84% nei topi BALB/c e nel criceto CB. Nel topo, la vaccinazione con FML in adiuvante saponina R (Riedel de Haen), QuilA e Qs21 si è dimostrata superiore a quella con altri adiuvanti (alluminio idrossido, Freund incompleto, BCG) e non ha indotto effetti tossici.

Sulla base di questi risultati, recentemente è stato registrato in Brasile l'FML-vaccino, denominato Leishmune® (Fort Dodge Animal Health Brazil), che è stato legalmente autorizzato per l'uso da parte dei clinici veterinari per la profilassi della leishmaniosi viscerale canina (de Andrade *et al.*, 2007).

L'FML-vaccino è formulato con la saponina Riedel de Haen che contiene come adiuvante attivo l'aldeide QS21 contenente saponina (18%), ed un composto di due aldeidi deacilate contenenti saponine derivate dalla *Quillaja saponaria* Molina (19.4%). Tutte le aldeidi contenute nel vaccino presentano il tipico gruppo aldeidico in posizione C-24, responsabile dell'interazione con i linfociti T helper e dell'induzione di una risposta immunitaria Th1 (Parra *et al.*, 2007).

Il vaccino brasiliano ha mostrato un'efficacia clinica del 76-80% nei primi due studi effettuati, che avevano però il limite di basarsi su soli riscontri clinici (da Silva *et al.*, 2000, vaccino senza saponina; Borja-Cabrera *et al.*, 2002, vaccino con saponina). Il terzo studio (Nogueira *et al.*, 2005), che ha valutato il vaccino con una diversa saponina, si è avvalso di indagini più specifiche come la PCR, riportando una protezione verso la malattia pari al 100%. I trial di efficacia di fase III del vaccino FML sono stati condotti in zone del Brasile endemiche sia per l'uomo che per il cane. Nel primo trial, due anni dopo il protocollo vaccinale completo nel cane e un richiamo annuale, è stata ottenuta una protezione pari al 92% e un'efficacia vaccinale



del 76%. In un secondo trial di fase III, utilizzando l'antigene FML in formulazione con saponina QuilA, si è ottenuta una protezione del 95% ed un'efficacia vaccinale dell'80%. Tre anni e mezzo dopo la vaccinazione, non è stato possibile riscontrare il DNA del parassita negli animali vaccinati.

Recentemente è stato, inoltre, valutato il potenziale effetto immunoterapeutico sulla leishmaniosi canina del vaccino FML prodotto con dosi più concentrate di adiuvante, in cani FML-sieropositivi ma completamente asintomatici con infezione sperimentale da *L. donovani* (vaccino FML-QuilA) e con infezione naturale da *L. chagasi* (vaccino FML-saponina R). Nel primo gruppo la protezione è stata ottenuta in 3 cani su 5, che rimanevano asintomatici e liberi dal parassita un anno dopo l'infezione. Nel secondo gruppo, i cani trattati mostravano IgG1 anti-FML di livello stabile, IgG2 in aumento ed il 79-95% di risposta DTH (ipersensibilità ritardata) positiva durante tutto il trial. Ventidue mesi dopo la vaccinazione, il 90% dei cani era ancora asintomatico, sano e libero dal parassita.

Gradoni *et al.* (2005), hanno sperimentato in una zona endemica del Sud Italia un vaccino multi-subunità ricombinante per *Leishmania* (MML). Nella prova sono stati somministrati a tre gruppi costituiti da 15 cani Beagle sani, i seguenti vaccini:

Vaccino A= MML+MPL®-SE adiuvante primario (3 iniezioni mensili)

Vaccino B= Soluzione salina sterile (controllo) (3 iniezioni mensili)

Vaccino C= MML+Adiuvante primario (3 iniezioni mensili)

Su 15 cani infetti, la progressione della malattia è stata riscontrata in 5 cani su 6 nel Gruppo A, in 3 cani su 6 nel Gruppo B, ed in 2 cani su 3 nel Gruppo C. Tali risultati hanno portato alla conclusione che la vaccinazione con MML non può essere considerata uno strumento efficace per la prevenzione dell'infezione da *Leishmania*.

Sempre nel 2005, Aguilar-Be *et al.*, hanno condotto uno studio sul complesso del ligand fucosio-mannosio (FML) di *L. donovani*, che è risultato essere un candidato vaccinale promettente contro la leishmaniosi viscerale in vari modelli animali, topo e cane compresi. Sia il complesso purificato FML che l'idrolasi NH36 (principale componente immunogena dell'FML) possono indurre una forte risposta immunitaria ed una significativa



protezione eterologa contro l'infezione da *L. donovani*. In questo studio è stata esaminata la risposta immunitaria e la protezione indotta da FML, NH36 ricombinante (rNH36) e da un vaccino a DNA NH36 contro gli agenti della leishmaniosi viscerale (*L. chagasi*) e cutanea (*L. mexicana*) nei topi BALB/c. La miglior protezione è stata osservata nei topi immunizzati col vaccino a DNA VR1012-NH36, che ha indotto una riduzione del 88% nella carica parassitaria di *L. chagasi* ed una riduzione del 65% nelle dimensioni delle lesioni da *L. mexicana*. Inoltre, il vaccino a DNA ha indotto un aumento di 2-5 volte dei linfociti T CD4⁺ produttori IFN- γ , fornendo una forte immunoprotezione omologa ed eterologa contro la leishmaniosi viscerale e cutanea.

Attualmente è in fase di sperimentazione in Italia un vaccino prodotto dalla Fort Dodge, costituito da una frazione purificata di *L. infantum*.

Altro valido mezzo da attuare per il controllo della leishmaniosi viscerale è rappresentato dalla lotta effettuata nei confronti dei flebotomi, soprattutto nelle aree dove il rischio di trasmissione è molto elevato anche per gli uomini. L'ambiente preferito dai flebotomi è rappresentato dalle anfrattuosità del terreno, dalle crepe dei muri, dalle superfici asciutte, ma in un'atmosfera piuttosto secca e senza vento. Risulta quindi impossibile riuscire a delimitare le zone di sviluppo di questi insetti, il che porta alla effettiva impossibilità d'intervenire con mezzi di lotta chimica, perché troppo ampie sarebbero le aree sottoposte ad interventi insetticidi, con l'alto rischio di provocare dissesti ecologici da inquinamento ambientale.

L'unica soluzione resta quella di proteggere in maniera circoscritta il luogo dove il cane soggiorna mediante l'utilizzo di trappole costituite da carta oleata, nelle quali i flebotomi rimarrebbero invischiati, e verso le quali possono essere indirizzati da piccole sorgenti luminose poste in prossimità della cuccia; o di insetticidi come i piretroidi sintetici a cui sottoporre sistematicamente la cuccia od il canile (habitat ideale per i flebotomi).

Queste misure profilattiche rappresentano certamente accorgimenti da prendere in considerazione, anche se, ovviamente, non possono salvaguardare il cane dalla puntura dell'insetto soprattutto in virtù del fatto che le specie autoctone sono perlopiù esofile.



7. OBIETTIVI DEL LAVORO

I cani rappresentano l'unico serbatoio riconosciuto dei parassiti *Leishmania infantum*, ed essi giocano un ruolo centrale nel ciclo di trasmissione della malattia agli uomini mediante i flebotomi vettori (Ashford, 2000; Courtenay *et al.*, 2002). Numerosi studi hanno dimostrato che, nonostante il progredire delle indagini epidemiologiche, la reale incidenza e prevalenza della leishmaniosi canina è a tutt'oggi sottostimata (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Alvar *et al.*, 2004).

Dopo l'infezione alcuni cani riescono a controllare la moltiplicazione del parassita ed a non sviluppare la malattia a breve termine, qualche volta per anni o per l'intera vita dell'animale. Altri cani, il cui sistema immunitario reagisce in maniera diversa, dopo un periodo di incubazione variabile, sviluppano la forma clinica progressiva della malattia (Moreno and Alvar, 2002). La presenza dell'infezione latente nei cani anche per tutta la vita, è tipica e contribuisce al mantenimento della persistenza del parassita nelle regioni endemiche. Il controllo della malattia rappresenta un serio problema di sanità pubblica dal momento che sia i cani sintomatici che quelli asintomatici sono infettivi per i flebotomi vettori (Gradoni *et al.*, 1987; Molina *et al.*, 1994), ed i farmaci anti-*Leishmania* ad oggi disponibili hanno efficacia limitata (Herwaldt, 1999; Gradoni, 2001b).

I dati attualmente disponibili per la leishmaniosi canina non consentono di predire l'evoluzione della malattia nei cani infetti asintomatici. La manifestazione clinica e l'evoluzione della malattia dipendono da complesse interazioni fra il parassita e la risposta immunitaria dell'ospite, mentre la risoluzione dell'infezione dipende dalla capacità dei macrofagi dell'ospite di distruggere efficacemente il parassita. Questa attività è determinata dal bilancio tra un set eterogeneo di citochine (Rhalem *et al.* 1999).

Il concetto dell'eterogeneità della risposta immunitaria è stato introdotto in seguito alle osservazioni cliniche nell'infezione da *L. major* nei roditori: la stessa infezione in razze diverse di roditore si manifestava in forme cliniche diverse, oscillando da soggetti gravemente malati a soggetti completamente asintomatici. L'infezione di razze diverse di ratto con *L. major* ha permesso,



per la prima volta, la scoperta di due sottopopolazione di linfociti T helper CD4+, definite Th1 e Th2, associate rispettivamente alla resistenza o alla suscettibilità all'infezione. I linfociti T CD4+ si differenziano in base alle citochine che producono. Dopo la stimolazione antigenica, i linfociti Th1 permettono l'eliminazione del parassita intracellulare mediante la produzione di IL-2 e IFN- γ che, attivando i macrofagi, determinano la distruzione del parassita e l'attivazione dei linfociti B rilascianti immunoglobuline le quali, a loro volta, attivano il complemento e permettono la conversione dei linfociti T CD8+ in linfociti citotossici. I linfociti Th1 determinano un'immunità prevalentemente di tipo cellulare e si associano alla resistenza all'infezione da *Leishmania*. Al contrario, i linfociti Th2 producono IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-18 che inducono una potente sintesi di anticorpi neutralizzanti che non attivano il complemento e si associano ad un'azione antinfiammatoria. I linfociti Th2 non attivano meccanismi volti all'eliminazione del parassita intracellulare, e per questo motivo, si associano alla suscettibilità alla malattia (Fowell *et al.*, 1998; Rogers *et al.*, 2002; Sacks and Noben-Trauth, 2002; Gummy *et al.*, 2004).

Diversi studi hanno valutato la risposta immunitaria del cane durante l'infezione da *L. infantum* ed hanno suggerito che, come nei roditori, il cane presenta una dicotomia nell'espressione clinica dell'infezione. I cani infetti apparentemente sani, sono caratterizzati da una lieve risposta umorale e dalla presenza di un'immunità cellulare specifica contro la *Leishmania*. I cani infetti gravemente malati, sono caratterizzati da un'esagerata risposta umorale e da una risposta cellulare specifica assente o diminuita. Tuttavia, diversi autori hanno dimostrato che nel cane, ed anche nell'uomo, la dicotomia nella risposta immunitaria non è caratterizzata da una chiara risposta Th1 (resistenza) e Th2 (malattia), ma bensì da una risposta immunitaria di tipo misto Th1-Th2 nella resistenza (con predominanza di citochine di tipo Th1) (Pinelli *et al.*, 1994; Chamizo *et al.*, 2005) e una ridotta produzione di citochine (Santos-Gomes *et al.*, 2002; Alvar *et al.*, 2004), o con predominanza da citochine di tipo Th2 nella malattia (Quinnell *et al.*, 2001; Bracheler *et al.*, 2005).



Pazienti umani affetti da leishmaniosi viscerale presentano una minore dicotomia Th1/Th2, mentre è più comune il riscontro di risposte immunitarie di tipo eterogeneo, soprattutto nelle persone con infezione in corso (Kurkjian *et al.*, 2006).

Ulteriori studi sulla risposta immunitaria di cani sperimentalmente infetti hanno dimostrato che l'immunità protettiva è associata con la produzione di IL-2, IFN- γ e TNF- α da parte delle cellule polimorfonucleate del sangue periferico (PBMC) in aggiunta all'induzione di cellule T citotossiche parassita-specifiche (Moreno and Alvar 2002). L'attivazione dei macrofagi da parte dell'IFN- γ risulta nella produzione di ossido nitrico che media la distruzione dei parassiti intracellulari (Pinelli *et al.*, 1999; Gradoni and Ascenzi, 2004). Al contrario, lo sviluppo della malattia è associato alla produzione di altri tipi di citochine quali IL-10, IL-12 e IL-18.

Le biotecnologie hanno assunto un ruolo importante nella diagnostica di laboratorio ed in particolare in quella parassitologica. Negli ultimi dieci anni, la PCR è stata introdotta con successo anche in medicina veterinaria, ed ha dimostrato di essere un mezzo sensibile e potente per rilevare la *Leishmania* nei campioni clinici ed anche per caratterizzare le specie ed i ceppi isolati (Reale *et al.*, 1999; Brecelj *et al.*, 2000; Reithinger *et al.*, 2002; Bossolasco *et al.*, 2003; Manna *et al.*, 2004). Negli anni recenti la PCR convenzionale è stata usata anche per analizzare il profilo della risposta immunitaria anti-*Leishmania* sia nell'uomo che nei cani infetti (Pinelli *et al.*, 1999; Santos-Gomes *et al.*, 2002; Brachelente *et al.*, 2005; Chamizo *et al.*, 2005).

Un'evoluzione recente della PCR classica è rappresentata dalla PCR quantitativa (real-time PCR), che è in grado di rilevare e misurare con estrema precisione la quantità di un marker genetico della *Leishmania*, e contemporaneamente differenziare le varie specie di *Leishmania* (Schulz *et al.*, 2003; Vitale *et al.*, 2004).

In questo studio, il saggio di real-time PCR è stato utilizzato sia per misurare la carica di DNA della *Leishmania* nei differenti campioni di tessuto (sangue, puntato linfonodale e cute), sia i livelli di espressione di alcune citochine relative ai patterns immunitari Th1 e Th2 nel sangue di due



gruppi di cani asintomatici naturalmente infetti: il primo gruppo comprendeva 20 cani asintomatici che nel corso dello studio progrediscono verso la malattia; il secondo gruppo, altrettanti 20 cani asintomatici che restano tali per tutto il periodo dello studio (2 anni).

La quota di DNA di *Leishmania* nei diversi tessuti e i livelli di espressione delle citochine sono stati misurati anche in un gruppo di cani infetti sintomatici (malati) ed in un gruppo di cani sani, allo scopo di trovare una possibile connessione fra la quantità di parassiti presenti nei vari tessuti, l'accumulo di mRNA di alcune citochine e la progressione clinica della malattia.



8. MATERIALI E METODI

8.1 Animali

Questo studio è stato condotto su 60 cani naturalmente infetti da *L. infantum*, che vivono in un'area endemica della Regione Campania, appartenenti a razze diverse, di età compresa tra 1 e 10 anni. I soggetti sono stati raggruppati in due categorie -infetti e non-infetti- sulla base delle indicazioni fornite dall'esame clinico e dai risultati dei tests diagnostici aspecifici.

I cani infetti sono stati, a loro volta, suddivisi in tre gruppi sulla base del comportamento clinico da essi sviluppato nel corso dello studio:

- 20 soggetti asintomatici che restano tali per tutto il periodo di studio
- 20 soggetti asintomatici che invece sviluppano la malattia nel corso dei 2 anni di osservazione
- 20 soggetti malati sintomatici scelti come controlli positivi per confrontare i dati ottenuti dai primi due gruppi di cani infetti.

In questo modo, è stato selezionato un ampio pannello di cani, necessario per monitorare i livelli di citochine attraverso tutte le fasi di evoluzione della malattia.

Accanto ai suddetti soggetti, sono stati selezionati altri 20 cani non infetti scelti in un'altra regione d'Italia, l'Abruzzo, notoriamente indenne da leishmaniosi, che sono andati a costituire il gruppo dei controlli negativi. Le indicazioni fornite da questi soggetti sono state determinanti per definire i livelli basali di citochine in condizioni fisiologiche di normalità.

Tutti i cani, compresi i soggetti che costituiscono il gruppo dei controlli negativi, sono stati sottoposti ad esame clinico e prelievi di sangue utilizzati poi per eseguire oltre ai generici tests biochimici (concentrazione delle proteine totali e suo pattern elettroforetico, urea e creatinina), le indagini sierologiche di routine e l'analisi di PCR. Tutti i controlli sono stati eseguiti ogni 2 mesi per un periodo totale di studio di 2 anni. Durante tale periodo, una quota di cani è diventata sintomatica e l'infezione da *Leishmania* è stata



confermata mediante indagine di PCR e saggio di immunofluorescenza indiretta (IFAT). Mediante le stesse metodiche (IFAT e PCR) sono state escluse le co-infezioni da *Ehrlichia* in tutti i soggetti (Manna *et al.*, 2004).

La carica parassitaria è stata determinata contemporaneamente in differenti substrati biologici (sangue, puntato linfonodale e cute), ed i livelli di mRNA delle varie citochine sono stati valutati nel sangue prelevato da tutti i cani al momento della prima osservazione e ogni 2 mesi per tutto il periodo di studio.

8.2 Campioni biologici

I campioni di sangue intero sono stati raccolti in provette contenenti EDTA mediante prelievo dalla vena cefalica. I campioni di cute del peso di circa 30 mg sono stati ottenuti mediante biopsia effettuata nella parte superiore del corpo. L'aspirato linfonodale è stato ottenuto con l'utilizzo di un sottile ago da biopsia. I campioni sono stati conservati a -80°C .

8.3 Colture parassitarie

Il ceppo di riferimento IPT1 ZMON1 è stato ottenuto dalla collezione del Centro Nazionale di Riferenza della Leishmaniosi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia (Palermo). Il ceppo IPT1 e i ceppi isolati sono stati coltivati nel terreno di coltura agar Tobie (Tobie *et al.*, 1950) modificato da Evans con l'aggiunta del 15% di sangue di coniglio, del 5% di siero bovino fetale, di 250 μg di gentamicina/ml e 500 μg /ml di 5-fluorocitosina. Le colture sono state incubate a 25°C per 7 giorni.

8.4 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA da colture parassitarie è stata eseguita come descritto nel lavoro di Schonian *et al.* (1996), con alcune modifiche. Le colture parassitarie sono state centrifugate a $3,500 \times g$ a 4°C per 15 minuti e risospese in un tampone di lisi contenente 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, a pH 7.4, con l'1% di sodio dodecil solfato. La miscela è stata incubata per 30 minuti a 60°C , a cui successivamente è stata aggiunta la proteinasi K alla concentrazione finale di 0,1 mg/ml, il tutto è stato incubato



per 3 ore a 60 °C. In seguito a doppia estrazione con buffer di fenolo-cloroformio e alcool isoamilico (25:24:1, v/v/v), il DNA è stato precipitato con 0,3 M di sodio acetato, a cui sono stati aggiunti 2,5 volumi di etanolo freddo ed è stato, poi, mescolato per inversione. Il DNA è stato recuperato mediante una centrifugazione a 13,000 x g per 20 minuti e, dopo un lavaggio in etanolo al 70%, è stato risospeso in acqua distillata sterile.

Il DNA è stato estratto da sangue intero, aspirato linfonodale e biopsia cutanea mediante il kit QIAamp Blood and Tissue seguendo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA). La concentrazione e la purezza del DNA estratto è stata valutata spettrofotometricamente ad una assorbanza di 260 e 280 nm, rispettivamente.

8.5 Estrazione dell'RNA e produzione di cDNA

L'RNA totale è stato estratto da campioni di sangue intero utilizzando un kit commerciale della Promega. L'RNA è stato eluito in 100 µl di H₂O con dietil pirocarbonato (DEPC) e conservato a -80 °C fino al momento dell'uso. La sintesi di cDNA per valutare i livelli di mRNA delle citochine è stata effettuata usando un sistema di trascrizione inversa (Im Prom-IItm Reverse Transcription System).

8.6 Sintesi dei primers e delle sonde

La costruzione dei primers TaqMan e delle sonde è stata effettuata utilizzando il software "Primers Express" (Applied Biosystems). I primers e le sonde fluorogeniche per il DNA della *Leishmania* sono stati scelti nella regione costante del minicircolo del DNA del kinetoplasto (NCBI Accession Number AF291093). La sonda fluorogenica è stata marcata all'estremità 5' reporter con il fluorocromo 6-carbossi-fluorosceina (FAM) ed all'estremità 3' quencer con il fluorocromo 6-carbossi-tetrametil-rodamina (TAMRA) (Applied Biosystems). Tutti i primers e le sonde sono stati sintetizzati dalla Applied Biosystems. Nella [Tabella 3](#) sono riportate le sequenze dei primers e delle sonde del DNA di *L. infantum*, dei geni costitutivi della gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) e della β-actina e dell'mRNA delle citochine.

	Forward primer	Reverse primer	Probe
<i>Leishmania infantum</i>	5'-GGCGTTCTGCGAAAACCG-3'	5'-AAAATGGCATTTCGGGCC-3'	5'-AAAATGGCATTTCGGGCC-3'
GAPDH	5'-TCCTCTAGCCAAAGTCATCCATGA-3'	5'-GGCATGGACGGTGGTCAT-3'	5'-CCCTCCACGATGCCGAA-3'
β -ACTIN	5'-CTGGCACCACACCTTCTACAA-3'	5'-GCCTCGGTCAGCAGCA-3'	5'-CCACGCGCAGCTCG-3'
INF- γ	5'-GCGGAAAAGGAGTCAGAATCTGTT-3'	5'-CAGGCAGGATGACCATTATTTCTGA-3'	5'-TCGAGGCCGCAGAGCA-3'
IL-2	5'-GAAGTGCTAGGTTTACCTCAAAGC-3'	5'-CAGATCCCTTTAGTTTCAGAAGTGTTACA-3'	5'-ACACCAAGGAATTAATCAGC-3'
IL-4	5'-GCTCCAAAGAACACAAGCGATAAG-3'	5'-CTGCCGCAGTACAGTAGCA-3'	5'-CTCTGCAGAAGATTTTC-3'
IL-10	5'-CCTGGGAGAGAAGCTCAAGAC-3'	5'-CACAGGGAAGAAATCGGTGACA-3'	5'-CTGAGACTGAGGCTGCGAC-3'
IL-12	5'-TGTCAAAAGTAGCAGAGGCTTCTC-3'	5'-CCTCTCTGCTGAAAGTGTCAC-3'	5'-CTCCACATGTCACCCCTTG-3'
IL-18	5'-GTACAGATAATGCACCCCATACCAT-3'	5'-ACTTCACAGAGATAGTTACTGCCAGA-3'	5'-CCTCTAGTGAGGCTATCTTT-3'

Tabella 3 . Primers e sonde della *Leishmania infantum*, del GAPDH, della β -actina e delle citochine.



8.7 Real-time PCR

Le reazioni di real-time PCR sono state effettuate in 25 μ l di una miscela di reazione contenente 12,5 μ l TaqMan Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM di ciascun primer, 250 nM della sonda fluorogenica e 50 ng di DNA o cDNA. Le reazioni sono state condotte nello strumento Abi Prism 7000 (Applied Biosystems); le condizioni utilizzate sono state le seguenti: un'iniziale incubazione per 2 minuti a 50 °C, seguita da una fase di denaturazione per 10 minuti a 95 °C per l'attivazione della AmpliTaq Gold, ed infine 50 cicli a 95 °C per 15 secondi e 60 °C per 1 minuto, ciascuno. I campioni sono stati amplificati in tubi separati su piastra per real-time PCR a 96 pozzetti ed in ogni piastra sono stati inclusi uno standard (controllo positivo) ed un controllo negativo.

Il valore di ciclo soglia (Ct) per ciascun campione è stato calcolato determinando il punto in cui l'intensità della fluorescenza supera il valore basale. Per normalizzare eventuali differenze nell'efficienza di estrazione dei campioni o della sintesi di cDNA mediante trascrittasi inversa sono stati utilizzati la β -actina ed il GAPDH come geni costitutivi (housekeeping).

Una curva standard è stata preparata utilizzando sette differenti concentrazioni di DNA di *Leishmania*. Per costruire la curva standard, una soluzione madre di DNA di *L. infantum* è stata ottenuta mediante estrazione di DNA da 10^9 promastigoti. La concentrazione del DNA è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica alle lunghezze d'onda di 260 nm e 280 nm e mediante gel elettroforesi. Sono state preparate diluizioni scalari della soluzione madre di DNA per ottenere una curva di concentrazioni di DNA corrispondenti ad un intervallo che varia da 10^6 parassiti fino a 1 parassita/ μ l. Per determinare la quantità di *Leishmania* nei tessuti è stato utilizzato il DNA estratto dal linfonodo come calibratore, perché ha presentato i più alti livelli di espressione di GAPDH.

Per ottenere le curve standard necessarie per la relativa quantizzazione dei livelli di espressione delle citochine sono stati utilizzate diluizioni scalari di una soluzione madre di RNA totale accuratamente diluita. I livelli di espressione delle citochine di cani sani sono stati scelti come calibratori. Sono state preparate curve standard sia per il gene bersaglio che per il gene



costitutivo. Per ogni campione sperimentale è stata determinata la quantità sia del gene bersaglio che del gene costitutivo dalla relativa curva standard. Infine, dal rapporto tra la quantità di DNA del gene bersaglio e quella del gene costitutivo si è ottenuto il valore normalizzato. I relativi livelli di espressione delle citochine sono stati ottenuti dal rapporto tra ciascuno dei valori normalizzati ottenuti e quelli del calibratore.



9. RISULTATI

a) Quantità di DNA di *Leishmania* e misura dei livelli di espressione delle citochine nei cani infetti asintomatici progredienti verso la malattia.

Il gruppo di 20 cani selezionati per questo studio non mostrava segni clinici di infezione al momento della diagnosi. Tutti i parametri ematologici e biochimici erano nella norma. I cani presentavano, tuttavia, un titolo positivo all'IFAT oscillante tra 1:40 e 1:640 e risultavano positivi alla PCR in almeno uno dei campioni biologici testati (sangue, puntato linfonodale, cute).

La presenza di piccole quantità di *Leishmania* è stata osservata nel sangue e nei linfonodi di questi cani mediante real-time PCR, mentre livelli molto elevati di parassiti erano presenti nelle biopsie cutanee (>700 *Leishmania*/ml) (Figura 15A). Nelle condizioni sperimentali utilizzate, la variabilità intra-analisi della quantificazione era in un range del <2%, concordante con quella di altri studi (Schulz *et al.*, 2003). L'analisi dei livelli di espressione delle citochine nei campioni di sangue di questi cani mediante real-time PCR ha mostrato la presenza di alti livelli di IL-18, mentre le altre citochine in esame erano assenti (Figura 15B).

Nei quattro mesi successivi alla prima osservazione, i cani hanno sviluppato due o più segni clinici di malattia (febbre, zoppia, linfadenopatia, lesioni della cute e ulcere, alopecia, dimagrimento, onicogrifosi). Sono comparse trombocitopenia, anemia e leucopenia. I titoli IFAT sono aumentati e l'analisi di PCR è risultata positiva in tutti i campioni biologici testati.

Sei mesi dopo la prima osservazione, la quantità di DNA della *Leishmania* misurata mediante real-time PCR ha superato le 2300 *Leishmania*/ml nei campioni linfonodali. Un aumento della quantità di parassita è stato anche osservato nei campioni di sangue, pur se di grado minore, mentre il numero di parassiti rilevati a livello dei campioni di cute risultava diminuito (Figura 15C). Nella Figura 15D è riportato il profilo di espressione delle diverse citochine nel sangue di questi cani.



Mentre i trascritti di mRNA dell'IL-18 sono diminuiti, i livelli delle IL-2, IL-4 e IL-10 sono risultati aumentati. Sono stati osservati, inoltre, bassi livelli di IFN- γ ed una quantità significativa di IL-12.



b) Quantità di DNA di *Leishmania* e misura dei livelli di espressione delle citochine nei cani infetti asintomatici che restano tali per periodi prolungati.

Il secondo gruppo di 20 cani selezionati per questo studio non mostrava segni clinici dell'infezione da *Leishmania* al momento della prima osservazione. Tutti i parametri ematologici e biochimici rientravano nei range di normalità, ma i cani erano sierologicamente positivi (titolo IFAT compreso tra 1:40 e 1:320), e la PCR risultava positiva in almeno uno dei campioni biologici testati. La quantità di parassiti misurata mediante real-time PCR nei tessuti di tali cani era elevata nella cute (>1300 *Leishmania*/ml) e nei linfonodi (>500 *Leishmania*/ml), ma più basso nel sangue (Figura 15A). Sono stati rilevati i livelli di espressione delle citochine nel sangue di questi cani mediante real-time PCR, che hanno mostrato alti livelli di IFN- γ , IL-2 e IL-18 (Figura 15B).

Sei mesi dopo, i cani erano ancora poco sintomatici; nonostante ciò, il titolo IFAT era aumentato ed alcuni parametri ematologici e biochimici, come il numero di globuli rossi e globuli bianchi, l'AST, l'ALT e la γ -GT, erano alterati. La quantità di *Leishmania* misurata con real-time PCR era di poco aumentata nei campioni di sangue e linfonodo, mentre risultava immodificata nei campioni di cute (Figura 15C). Contemporaneamente, il profilo di espressione delle citochine nel sangue di tali cani risultava modificato dalla comparsa delle citochine IL-4 e IL-10, oltre alla presenza di IFN- γ , IL-2 e IL-18. L'unica citochina assente era IL-12 (Figura 1D).

I cani sono stati monitorati 18 mesi dopo la prima osservazione. Durante tale periodo, si è osservato una diminuzione della quantità di *Leishmania* in tutti e tre i campioni biologici saggiati mediante real-time PCR. Tuttavia, alla fine del periodo dello studio (24 mesi dopo la prima osservazione) il numero di parassiti nel sangue, nei linfonodi e nella cute era ancora significativo, <100 , <300 e <10 *Leishmania*/ml rispettivamente (Figura 15E). Il profilo di espressione delle citochine mostrava una progressiva scomparsa di tutte le citochine, tranne dell'IL-4 che era ancora presente in maniera significativa nel sangue dei cani alla fine dello studio (Figura 15F).



c) Quantità di DNA di *Leishmania* e misura dei livelli di espressione delle citochine nei cani malati sintomatici (controlli positivi), e nei cani sani non infetti (controlli negativi).

Un gruppo di 20 cani sintomatici naturalmente infetti è stato scelto come controllo positivo. Al momento della diagnosi, questi cani mostravano titoli sierologici elevati (titolo IFAT compreso tra 1:160 e 1:1280), e si mostrarono positivi alla PCR in tutti i campioni biologici saggiati. All'esame clinico i cani presentavano sia lesioni cutanee che viscerali. Tutti i cani mostravano trombocitopenia, anemia, leucopenia ed un aumento delle proteine totali. Nelle biopsie linfonodali di tali cani si è riscontrato un'elevata quantità di *Leishmania* (Figura 16A). Anche se in minor grado, la *Leishmania* era presente anche negli altri due tessuti testati. Il profilo dei livelli di espressione delle citochine ha mostrato livelli significativi di espressione di tutte le citochine misurate nel sangue di tali cani (Figura 16B). L'esame comparativo dei livelli di citochine in tali cani ha dimostrato che la proporzione fra l' IFN- γ e le altre citochine nel gruppo dei cani controllo positivo era simile al quadro presente negli animali asintomatici che si ammalavano, anche se a livelli più bassi. La *Leishmania* era presente anche negli altri due tessuti saggiati, ma in minore quantità.

Un altro gruppo di 20 cani sani viventi in aree non endemiche è stato selezionato come controllo negativo. L'analisi di PCR dei campioni tissutali, così come l'IFAT hanno fornito risultato negativo. La *Leishmania* non era presente in nessuno dei campioni biologici analizzati e la quantificazione mediante real-time PCR dei livelli di espressione delle citochine nei campioni di sangue di questi cani ha evidenziato la presenza di livelli significativi solo dell'IL-18 (dati non mostrati).



- ▨ Cani che progrediscono verso la malattia
▤ Cani che restano asintomatici

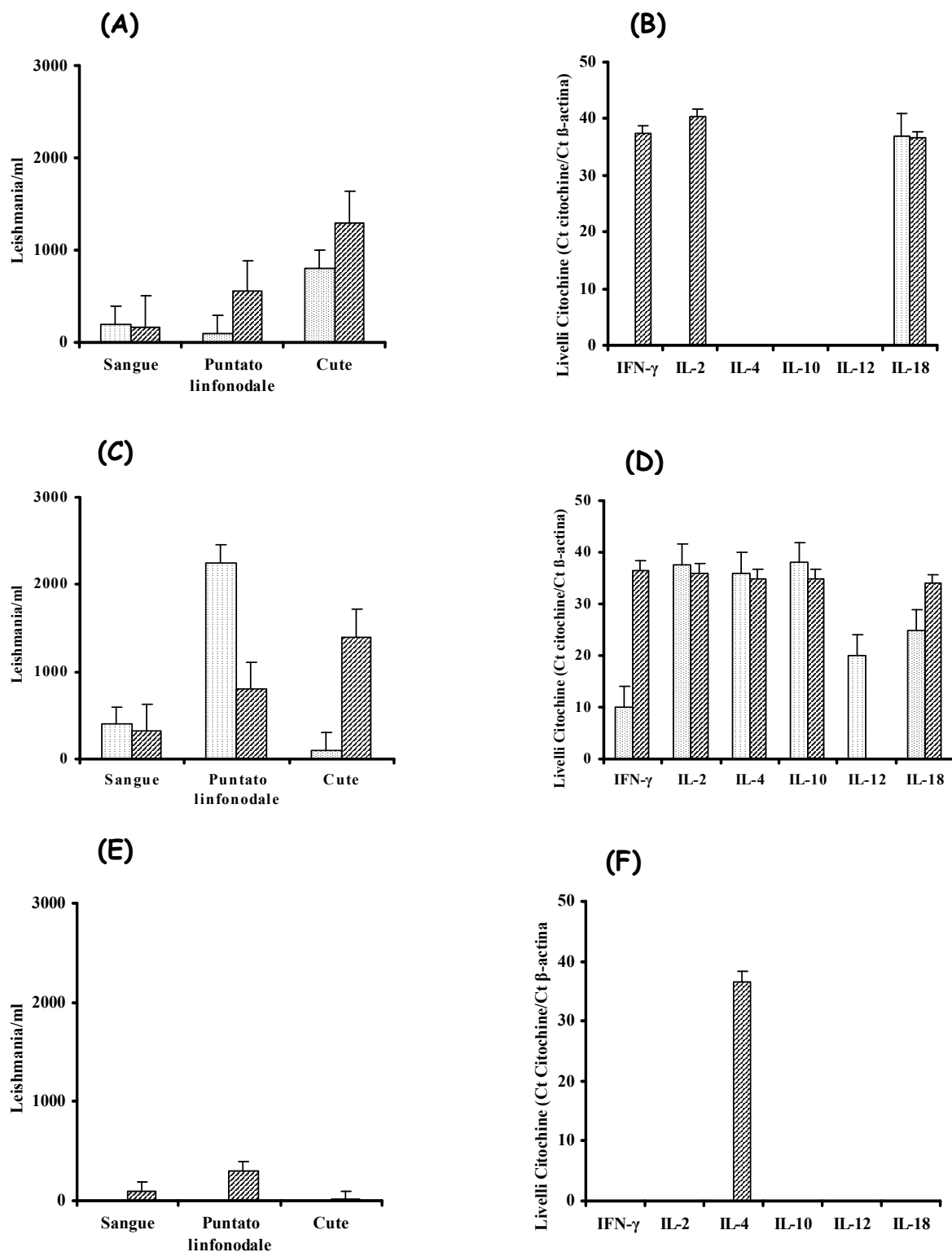


Figura 15. Quantità di DNA della *Leishmania* e livelli di espressione delle citochine nei cani che progrediscono verso la malattia ed in quelli che restano asintomatici per tutto il periodo di studio.

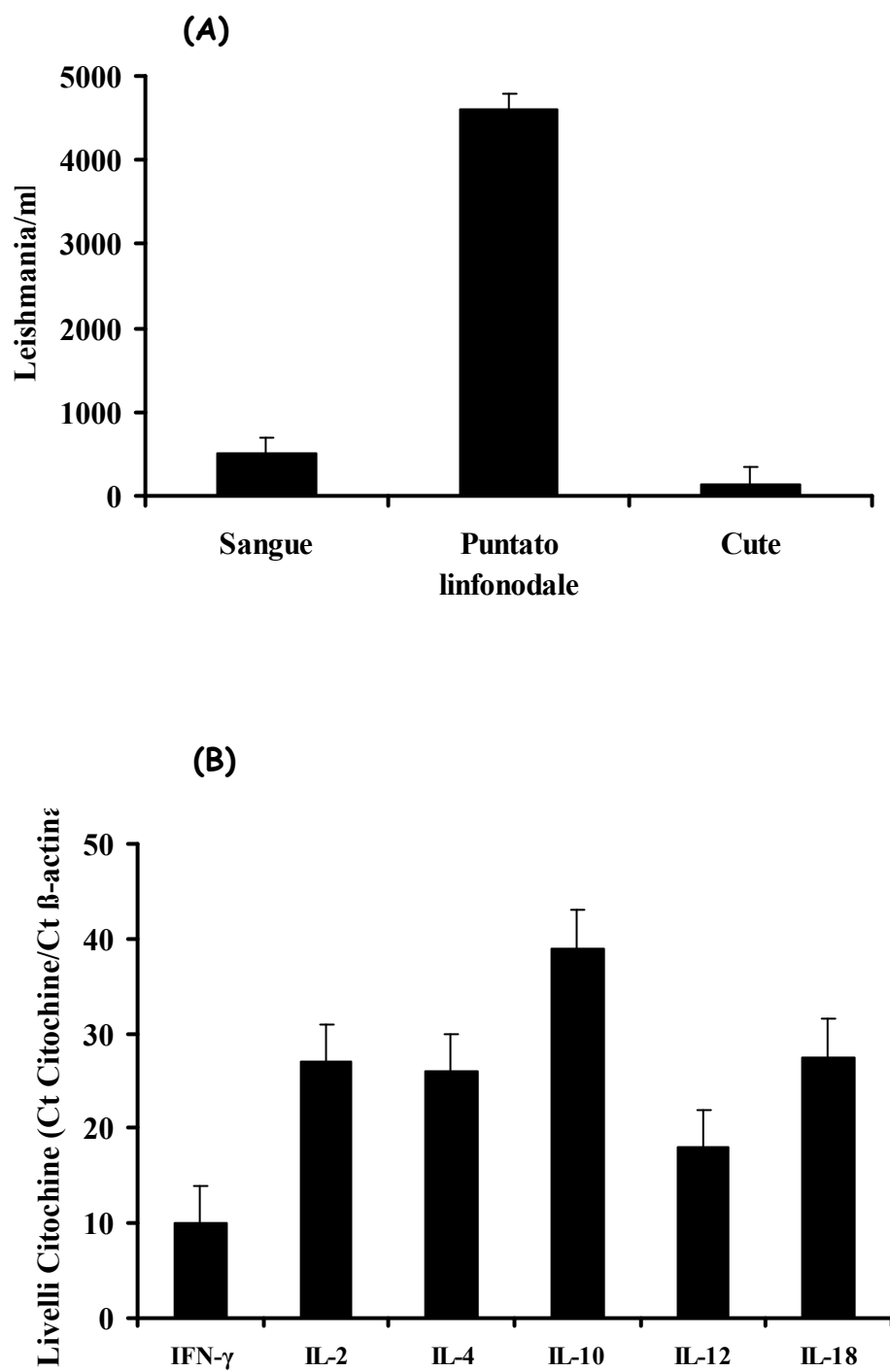


Figura 16. Quantità di DNA della *Leishmania* e livelli di espressione delle citochine nei cani appartenenti al gruppo dei controlli positivi.



10. DISCUSSIONE

Il sistema immunitario del cane gioca un ruolo chiave sia nell'insorgenza dell'infezione da *Leishmania*, sia nella risposta alla terapia (Pinelli *et al.* 1994; Guarga *et al.*, 2002). I cani che mostrano un'efficiente risposta immunitaria sono in grado di controllare l'infezione, mentre quelli con un sistema immunitario inefficiente sviluppano un quadro clinico severo e spesso non rispondono alla terapia o recidivano. Non è, tuttavia, sempre agevole trovare dei parametri che possano predire accuratamente l'evoluzione e la risposta soggettiva all'infezione.

In questo studio, il sistema della real-time PCR è stato utilizzato per correlare la quantità di DNA della *Leishmania* ed i livelli di espressione delle citochine in campioni biologici di cani asintomatici naturalmente infetti, con lo stato clinico e l'evoluzione della malattia.

La quantificazione dei parassiti presenti nei tre tessuti esaminati (sangue, puntato linfonodale e cute) ha mostrato la presenza di differenze tra i due gruppi di cani selezionati. Nei cani infetti asintomatici che hanno sviluppato la malattia, sono state ritrovate elevate quantità di DNA di *Leishmania* nelle biopsie cutanee al momento della diagnosi. La quantità di DNA di parassita presente nella cute, tuttavia, è diminuita con la comparsa dei sintomi clinici, mentre si è registrato un drammatico incremento della quota di *Leishmania* negli aspirati linfonodali di questi soggetti.

Nel secondo gruppo di cani che è rimasto asintomatico durante il periodo dello studio, al tempo della prima osservazione, è stata riscontrata un'elevata quantità di *Leishmania* sia nelle biopsie cutanee che negli aspirati linfonodali. Successivamente la quota di DNA di *Leishmania* è diminuita in tutti e tre i tessuti. Tuttavia, sei mesi dopo la prima osservazione, la quantità di parassiti era ancora significativa nella cute ma aumentata nei linfonodi, seppure in misura inferiore. Tali risultati suggeriscono che nel cane la cute può rappresentare un serbatoio di amastigoti quando l'ospite è immunocompetente, in un equilibrio ospite-parassita che simula la fase finale dell'infezione da *L. major* nel modello murino (Belkaid *et al.*, 2000). In questo modello, la fase finale è caratterizzata dalla persistenza del parassita



nel sito cutaneo di inoculo per più di un anno dalla risoluzione delle lesioni cutanee. La persistenza di tale quota parassitaria può essere dovuta alla stimolazione costante delle cellule T della memoria, che forniscono così protezione dall'infezione.

Contrariamente ai numerosi dati esistenti sul modello di leishmaniosi nel topo, non esistono molte informazioni sulle basi immunologiche della leishmaniosi nel cane. E' stato, tuttavia, dimostrato che circa il 50% dei cani infetti sieropositivi asintomatici può infettare i flebotomi in una proporzione uguale ai cani sintomatici (Molina *et al.*, 1994; Travi *et al.*, 2001; Courtenay *et al.*, 2002; Chamizo *et al.*, 2005). L'alta quota parassitaria osservata nella cute del gruppo di cani asintomatici che restano tali per tempi prolungati, mette in luce la loro importanza quali ospiti serbatoi.

I risultati ottenuti dall'analisi dei due gruppi di cani indicano che la cute rappresenta un mezzo affidabile per la diagnosi ed il follow-up della leishmaniosi viscerale nei cani infetti asintomatici; che la misura della quantità di DNA di *Leishmania* nel linfonodo è necessaria per predire l'evoluzione della malattia; ed inoltre che la quantificazione del parassita nel sangue dei cani infetti appare non essere critica per il management clinico dell'infezione.

Studi precedenti hanno dimostrato che i cani infetti asintomatici possono sviluppare sia immunità cellulare specifica per la *Leishmania* sia immunità umorale (Pinelli *et al.*, 1994, Cabral *et al.*, 1998). In particolare, è stato osservato che le cellule T dei cani infetti asintomatici producono livelli di IL-2 e TNF in risposta all'antigene *Leishmania* più significativi rispetto ai cani infetti sintomatici o ai cani sani controllo (Pinelli *et al.*, 2000; Chamizo *et al.*, 2005).

Le citochine IFN- γ e IL-2 sia nell'uomo che nel topo attivano i macrofagi a distruggere il parassita (Liew and O'Donnel, 1993). La stimolazione di cellule polimorfonucleate di sangue periferico (PBMC) da cani sani con il mitogeno generico concanavalina A (ConA) è risultata in un mix di citochine, sia di tipo Th1 che Th2, senza una chiara prevalenza dell'uno rispetto all'altro. Inoltre, Carvalho *et al.* (1992), hanno osservato alti livelli di IFN- γ in pazienti umani oligosintomatici in cui la malattia evolve a cura



spontanea. L'accumulo di mRNA di IFN- γ è stato anche osservato in cani sia asintomatici che sintomatici infetti da *L. infantum* (Quinnell *et al.*, 2001). Tale accumulo è stato correlato positivamente con le risposte umorali (IgG1) ma non con quelle linfo-proliferative agli antigeni di *Leishmania* nei cani infetti.

In questo studio, alti livelli di IL-2 e IFN- γ sono stati osservati al tempo della prima osservazione nei cani asintomatici che sono rimasti tali per tutto il periodo dello studio. L'espressione di queste citochine decresce con il tempo. Al contrario, nel sangue dei cani appartenenti al gruppo di soggetti che progrediscono verso la malattia, l'IFN- γ e l'IL-2 non sono espresse al momento della prima osservazione, mentre i livelli della loro espressione sono aumentati dopo la comparsa dei segni clinici. I nostri risultati suggeriscono che alti livelli di IFN- γ e IL-2 non associati a segni clinici rendono il paziente resistente alla progressione della malattia. La risposta immunitaria di tipo Th2 diventa predominante nel momento in cui i cani sviluppano la malattia clinica. Perciò, anche se ulteriori studi sono necessari per rivelare più chiaramente i ruoli svolti da queste due citochine nella leishmaniosi canina, l'IFN- γ e l'IL-2 possono rappresentare markers ottimali nei cani infetti asintomatici per predire la progressione della malattia.

L'IL-10 è ritenuta da molti autori elemento determinante di una risposta immunitaria inadeguata e persistente dell'ospite, ed è stata associata alla soppressione della produzione di citochine mediata dalle cellule Th1, allo sviluppo di una risposta immunitaria di tipo Th2, ed ad un ritardo dell'attivazione macrofagica leishmanicida (Mosmann and Moore, 1991). O'Garra and Vieira (2007) hanno dimostrato che l'IL-10 riveste un ruolo di regolazione in senso soppressivo della risposta immunitaria cellulo-mediata, senza annullarla completamente ma comunque inducendo uno stato d'infezione persistente. Studi recenti nel topo e nell'uomo hanno evidenziato la presenza di alti livelli di IL-10 in corso di leishmaniosi viscerale attiva (Kurkjian *et al.*, 2006), mentre esistono dati controversi sull'accumulo di mRNA di IL-10 nei cani infetti (Goto and Lindoso, 2004).



Mentre Pinelli *et al.* (1999) hanno evidenziato elevati livelli di mRNA di IL-10 nei PBMC ConA-stimolati nei cani infetti da *Leishmania* rispetto ai cani controllo non infetti, altri autori non sono riusciti ad evidenziare alti livelli di mRNA di IL-10 nei tessuti di cani naturalmente (Quinnell *et al.*, 2001) o sperimentalmente (Santos-Gomes *et al.*, 2002) infetti.

Nel nostro studio, l'IL-10 è stata espressa in entrambi i gruppi di cani infetti asintomatici: in un gruppo dopo la comparsa dei segni clinici, nell'altro gruppo (asintomatici persistenti) quando la carica di *Leishmania* era aumentata. Perciò, i nostri risultati suggeriscono che questa citochina non è un segno caratteristico di malattia attiva nei cani naturalmente infetti.

Anche se è stato suggerita una relazione positiva tra la comparsa dell'IL-4 e la gravità della malattia, il ruolo dell'IL-4 nella leishmaniosi viscerale canina resta ancora controverso. L'IL-4 sierica è stata evidenziata in alcuni studi clinici, ma non in altri. Quinnell *et al.* (2001) hanno osservato un piccolo accumulo di questa citochina nelle biopsie di midollo osseo solo in una discreta percentuale di cani infetti. Nel nostro studio, questa citochina è stata espressa in entrambi i gruppi dei cani infetti asintomatici: nel primo gruppo quando l'infezione è progredita verso la malattia, e 6 mesi dopo la prima osservazione nell'altro gruppo. I livelli di questa citochina si sono mantenuti alti durante tutto il periodo dello studio in entrambi i gruppi dei cani.

L'IL-12 è stata associata con una risposta immunitaria protettiva nei confronti della leishmaniosi umana, mediante l'attivazione macrofagica e la conseguente fagocitosi degli organismi *Leishmania*. Essa esercita la sua influenza grazie ad un'up-regolazione della produzione di IFN- γ , alla differenziazione delle cellule Th1 e all'esaltazione della loro attività citolitica (Santos-Gomes *et al.*, 2002; Kurkjian *et al.*, 2006).

L'IL-18 gioca un ruolo importante nell'innescare la produzione di IFN- γ dalle cellule Th1 e dalle cellule Natural Killer (NK), nonché nel potenziamento della loro citotossicità (Akira, 2000; Chamizo *et al.*, 2005). Quinnell *et al.* (2001) hanno dimostrato che la presenza dell'IL-18 in cani asintomatici con immunità cellulo-mediata alla *Leishmania*, è responsabile della resistenza al parassita.



Nel nostro studio, l'IL-12 è stata espressa solo nel gruppo di cani infetti asintomatici che progrediscono verso la malattia al momento della comparsa dei segni clinici, mentre l'espressione dell'IL-18 era alta in entrambi i gruppi. Solo nei cani infetti asintomatici persistenti per tutto il periodo dello studio, i livelli di IL-18 sono diminuiti 24 mesi dopo la prima osservazione. Questi risultati suggeriscono che mentre l'IL-12 rappresenta un marker di malattia attiva, l'IL-18 potrebbe non essere coinvolta nei meccanismi che inducono alla progressione dalla malattia asintomatica alla forma sintomatica.



11. CONCLUSIONI

I nostri risultati indicano che c'è una correlazione tra lo stato clinico, i livelli di espressione delle citochine e la quantità di *Leishmania* presente nei tessuti dei cani naturalmente infetti. La real-time PCR è il miglior mezzo disponibile per confrontare la risposta Th1/Th2 all'infezione da *Leishmania*. Al momento della prima osservazione, i cani asintomatici naturalmente infetti che progrediscono verso la malattia non esprimono altre citochine all'infuori dell'IL-18, mentre sei mesi più tardi il loro profilo citochinico ha mostrato una risposta immunitaria Th2 dominante. Di contro, i cani asintomatici che restano tali per un periodo prolungato, al momento della prima osservazione hanno mostrato una predominanza della risposta Th1 mediata dall'IL-2, dall'IFN- γ e dall'IL-18.

Dal momento che la comparsa di sensibilità e resistenza citochinica sembra giocare un ruolo importante nello sviluppo dell'infezione nei cani asintomatici naturalmente infetti, i nostri risultati suggeriscono che la valutazione dei livelli di espressione citochinica può rappresentare un mezzo sicuro per predire lo sviluppo della malattia.

I nostri risultati potrebbero essere vantaggiosi per il management clinico della forma asintomatica della malattia, specialmente in quelle aree dove la *Leishmania* è presente in forma endemica.



12. BIBLIOGRAFIA

- ACHTERBERG, V., GERCKEN, G., 1987. Cytotoxicity of ester and ether lysophospholipids on *Leishmania donovani* promastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. 23,117-122.
- AGU, W.E., FARRELL, J.P., SOULSBY, E.J., 1982. Pathogenesis of anemia in hamster infected with *Leishmania donovani*. Z. Parasitenkd. 68, 27-32.
- AGUILAR-BE, I., DA SILVA ZARDO, R., PARAGUAI DE SOUZA, E., BORJA-CABRERA, G.P., ROSADO-VALLADO, M., MUT-MARTIN, M., GARCÍA-MISS MDEL, R., PALATNIK DE SOUSA, C.B., DUMONTEIL, E., 2005. Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. Infect. Immun. 73, 812-819.
- AKIRA, S., 2000. The role of IL-18 in innate immunity. Curr. Opin. Immunol. 12, 59-63.
- ALVAR, J., GUTIERREZ-SOLAR, B., PACHON, I., CALBACHO, E., RAMIREZ, M., VALLES, R., GUILLEN, J.L., CANAVATE, C., AMELA, C., 1996. AIDS and *Leishmania infantum*. New approaches for a new epidemiological problem. Clin. Dermatol. 14, 541-546.
- ALVAR, J., CANAVATE, C., MOLINA, R., MORENO, J., NIETO, J., 2004. Canine Leishmaniasis. Adv. Parasitol. 57, 1-88.
- ALVAR, J., CROFT, S., OLLIARO, P., 2006. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. Adv. Parasitol. 61, 223-274.
- AMARA, A., JEMLI, M.H., KILANI, M., GHORBEL, A., AOUINA, M., 2000. Un cas de dermatite leishmanienne nodulaire chez un chien. Point Vétérinaire 31, 514-516.
- ANDRADE, H.M., DE TOLEDO, V.DEP., MARQUES, M.J., FRANCA SILVA, J.C., TAFURI, W.L., MAYRINK, W., GENARO, O., 2002. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. Vet. Parasitol. 103, 71-81.
- ASHFORD, R.W., 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int. J. Parasitol. 30, 1269-1281.
- AWASTHI, A., MATHUR, R.K., SAHA, B., 2004. Immune response to *Leishmania* infection. Indian J. Med. Res. 119, 238-258.



- BANETH, G, SHAW, S.E., 2002. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 106, 315-324.
- BARBIERI, C.L., 2006. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 28, 329-337.
- BARROUIN-MELO, S.M., LARANGEIRA, D.F., TRIGO, J., AGUIAR, P.H., DOS-SANTOS, W.L., PONTES-DE-CARVALHO, L., 2004. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 195-197.
- BELKAID, Y., MENDEZ, S., LIRA, R., KADAMBI, N., MILON, G., SACKS, D., 2000. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J. Immunol.* 165, 969-977.
- BHATTACHARYA, S.K., JHA, T.K., SUNDAR, S., THAKUR, C.P., ENGEL, J., SINDERMAN, H., JUNGE, K., KARBWANG, J., BRYCESON, A.D., BERMAN, J.D., 2004. Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. *Clin. Infect. Dis.* 38, 217-221.
- BISWAS, T., CHAKRABORTY, M., NASKAR, K., GHOSH, D.K., GHOSAL, J., 1992. Anemia in experimental visceral leishmaniasis in hamsters. *J. Parasitol.* 78, 140-142.
- BIZZETI, M., DEGLI INNOCENTI, R., LUBAS, G., 1989. Diagnosi di laboratorio in leishmaniosi canina. Ed. Pizzirani Cremona, Società culturale italiana veterinaria animali da compagnia: 43.
- BLAVIER, A., KEROACK, S., DENEROLLE, P.H., GOY-THOLLOT, I., CHABANNE, L., CADORÉ, J.L., BOURDOISEAU, G., 2001. Atypical forms of canine leishmaniosis. *Vet. J.* 162: 108-120.
- BONGIORNO, G., HABLUETZEL, A., KHOURY, C., MAROLI, M., 2003. Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Trop.* 88, 109-116.



- BORJA-CABRERA, G.P., CORREIA PONTES, N.N., DA SILVA, V.O., PARAGUAI DE SOUZA, E., SANTOS, W.R., GOMES E.M., LUZ, K.G., PALATNIK, M., PALATNIK, DE SOUSA, C.B., 2002. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine* 20, 3277–3284.
- BOSSOLASCO, S., GAIERA, G., OLCHINI, D., GULLETTA, M., MARTELLO, L., BESTETTI, A., BOSSI, L., GERMAGNOLI, L., LAZZARIN, A., UBERTI-FOPPA, C., CINQUE, P., 2003. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5080–5084.
- BRACHELENTE, C., MULLER, N., DOHERR, M.G., SATTLER, U., WELLE, M., 2005. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T Helper-2–biased immune response. *Vet Pathol* 42, 166–175.
- BRECELJ, M., PIKELJ, F., GUBENSEK, F., ANDERLUH, G., 2000. Polymerase chain reaction as a diagnostic tool for detecting *Leishmania*. *Infection*. 28, 111–113.
- BURACCO, P., ABATE, O., GUGLIELMINO, R., MORELLO, E., 1997. Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in a dog. *J. Small. Anim. Pract.* 38, 29-30.
- CABRAL, M., O'GRADY, J.E., GOMES, S., SOUSA, J.C., THOMPSON, H., ALEXANDER, J., 1998. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* 76, 173–180.
- CAPELLI, G., BALZELLI, R., FERROGLIO, E., GENCHI, C., GRADONI, L., GRAMICCIA, M., MAROLI, M., MORTASINO, M., PIETROBELLI, M., ROSSI, L., RUGGIERO, M., 2004. Monitoring of canine leishmaniasis in northern Italy: an update from a scientific network. *Parassitologia* 46, 193-197.



- CARRASCO, L., DE LARA, F.C., MARTIN, E., HERVAS, J., MOLLEDA, J.M., GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C., LOPEZ, R., 1997. Acute haemorrhagic pancreatitis associated with canine visceral leishmaniosis. *Vet. Rec.* 141, 519–521.
- CARVALHO, E.M., BARRAL, A., PEDRAL-SAMPAIO, D., BARRAL-NETTO, M., BADARO, R., ROCHA, H., JOHNSON, W.D.JR., 1992. Immunological markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. *J. Infect. Dis.* 165, 535–540.
- CHAMIZO, C., MORENO, J., ALVAR, J., 2005. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103, 67–75.
- COLUCCI, G., 2000. New technologies and applications of PCR in clinical diagnosis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 16, 499-500.
- CORAZZA, M., MANCIANTI, F., POLI, A., TORRES S. 1999. Immunologia della leishmaniosi. *Obiettivi e documenti veterinari*, 6: 5-14.
- COURTENAY, O., QUINNELL, R.J., GARCEZ, L.M., SHAW, J.J., DYE, C., 2002. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J. Infect. Dis.* 186, 1314–1320.
- CRIADO-FORNELIO, A., GUTIERREZ-GARCIA, L., RODRIGUEZ-CAABEIRO, F., REUS-GARCIA, E., ROLDAN-SORIANO, M.A., DIAZ-SANCHEZ, M.A., 2000. A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Vet. Parasitol.* 92, 245-251.
- CROFT, S.L., SEIFERT, K., YARDLEY, V., 2006. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* 123, 399-410.
- DANTAS-TORRE, F., 2006. Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Vet. Parasitol.* 141, 1-8.



- da SILVA, V.O., BORJA-CABRERA, G.P., CORREIA PONTES, N.N., DE SOUZA, E.P., LUZ, K.G., PALATNIK M., PALATNIK de SOUSA, C.B., 2001. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). *Vaccine* 19, 1082–1092.
- DAVIES, C.R., COOPER, A.M., PEACOCK, C., LANE, R.P., BLACKWELL, J.M., 1990. Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology* 101, 337-343.
- de ANDRADE, R.A., REIS, A.B., GONTIJO, C.M., BRAGA, L.B., ROCHA, R.D., ARAUJO, M.S., VIANNA, L.R., MARTINS-FILHO, O.A., 2007. Clinical value of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116, 85–97.
- de FREITAS, E., MELO, M.N., da COSTA-VAL, A.P., MICHALICK, M.S., 2006. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet. Parasitol.* 137, 159-167.
- DENEROLLE, P., 1996. Leishmaniose canine: difficultés du diagnostic et du traitement (125 cas). *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie* 31, 137–45.
- DENEROLLE, P., BOURDOISEAU, G., 1999. Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J. Vet. Intern. Med* 13, 413-415.
- di MARTINO, L., GRAMICCIA, M., OCCORSIO, P., DI MUCCIO, T., SCALONE, A., GRADONI, L., 2004. Leishmaniosi viscerale infantile in Campania: l'esperienza del Centro Pediatrico di Riferimento. *Parassitologia* 46, 221-223.
- DINIZ, S.A., MELO, M.S., BORGES, A.M., BUENO, R., REIS, B.P., TAFURI, W.L., NASCIMENTO E.F., SANTOS, R.L., 2005. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Vet. Pathol.* 42, 650-658.



- DYE, C., VIDOR, E., DEREURE, J., 1993. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol. Infect.* 110, 647-656.
- FERRER, L., JUANOLA, B., RAMOS, J.A., RAMIS, A., 1991. Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. *Vet. Pathol.* 28, 342-343.
- FERRER L. 1999. Clinical aspects of canine Leishmaniasis. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona. ed. Hoechst Roussel Vet, 6-10.
- FIGUEIRÓ-FILHO, E.A., DUARTE, G., EL-BEITUNE, P., QUINTANA, S.M., MAIA, T.L., 2004. Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 12, 31-40.
- FISA, R., GÁLLEGO, M., CASTILLEJO, S., AISA, M.J., SERRA, T., RIERA, C., CARRIÓ, J., GÁLLEGO, J., PORTÚS, M., 1999. Epidemiology of canine leishmaniosi in Catalonia (Spain). The example of Priorat focus. *Vet. Parasitol.* 83, 87-97.
- FONT, A., DURALL, N., DOMINGO, M., CLOSA, J.M., MASCORT, J., FERRER, L., 1993. Cardiac tamponade in a dog with visceral leishmaniosis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 29, 95-100.
- FONT, A., GINES, C., CLOSA, J.M., MASCORT, J., 1994. Visceral leishmaniasis and disseminated intravascular coagulation in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, 1043-1044.
- FOWELL, D.J., BIX, M., SHINKAI, K., LACY, D., LOCKSLEY, R.M., 1998. Disease susceptibility and development of the cytokine repertoire in the murine *Leishmania major* model. *Eur. Cytokine Netw.* 9, 102-106.
- GARCIA-ALONSO, M., BLANCO, A., REINA, D., SERRANO, F.J., ALONSO, C., NIETO, C.G., 1996. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 18, 617-623.



- GASKIN, A.A, SCHANTZ, P., JACKSON, J., BIRKENHEUER, A., TOMLINSON, L., GRAMICCIA, M., LEVY, M., STEURER, F., KOLLMAR, E., HEGARTY, B.C., AHN, A., BREITSCHWERDT, E.B., 2002. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. J. Vet. Intern. Med. 16, 34-44.
- GAVGANI, A.S., HODJATI, M.H., MOHITE, H., DAVIES, C.R., 2002. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. Lancet 360, 374-379.
- GOMES, Y.M., PAIVA CAVALCANTI, M., LIRA, R.A., ABATH, F.G., ALVES, L.C., 2006. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. Vet. J. [Epub ahead of print]
- GOTO, H., LINDOSO, J.A., 2004. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. Braz. J. Med. Biol. Res. 37, 615–623.
- GRADONI, L., MAROLI, M., GRAMICCIA, M., MANCIANTI, F., 1987. *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. Med. Vet. Entomol. 1, 339–342.
- GRADONI, L., 2001a. Recent findings on the treatment of leishmaniasis. Ann. Ist. Super. Sanità 37, 255-263.
- GRADONI, L., 2001b. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. Vet. Parasitol. 100, 87–103.
- GRADONI, L., 2002. The diagnosis of canine leishmaniasis - in Second International Canine Leishmaniasis Forum (6-9 feb. 2002, Seville, Spain), Final programme - p.4
- GRADONI, L., ASCENZI, P., 2004. Nitric oxide and anti-protozoan chemotherapy. Parassitologia 46, 101–103.
- GRADONI, L., FOGLIA MANZILLO, V., PAGANO, A., PIANTEDOSI, D., DE LUNA, R., GRAMICCIA, M., SCALONE, A., DI MUCCIO, T., OLIVA, G., 2005. Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. Vaccine 23, 5245-5251.



- GRAUER, G.F., THOMAS, C.B., EICKER, S.W., 1985. Estimation of quantitative proteinuria in the dog, using the urine protein-to-creatinine ratio from a random, voided sample. *Am. J. Vet. Res.* 46, 2116-2119.
- GRISCELLI, F., BARROIS, M., CHAUVIN, S., LASTERE, S., BELLET, D., BOURHIS, J.H. 2001. Quantification of human cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients by Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4362-4369.
- GROGL, M., THOMASON, T.N., FRANKE, E.D., 1992. Drug resistance in Leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 117-126.
- GUARGA, J.L., MORENO, J., LUCIENTES, J., GRACIA, M.J., PERIBANEZ, M.A., CASTILLO, J.A., 2002. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88, 13-20.
- GUMY, A., LOUIS, J.A., LAUNOIS, P., 2004. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *Int. J. Parasitol.* 34, 433-444.
- HERWALDT, B.L., 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191-1199.
- HOFMAN, V., BROUSSET, P., MOUGNEAU, E., MARTY, P., LAMANT, L., ANTOINE, J.C., GLAICHENHAUS, N., HOFMAN, P., 2003. Immunostaining of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* using monoclonal antibody (19-11) to the *Leishmania* homologue of receptors for activated C-kinase. *Am. J. Clin. Pathol.* 120, 567-574.
- HONDOWICZ, B., SCOTT, P., 2002. Influence of parasite load on the ability of type 1 T cells to control *Leishmania major* infection. *Infect. Immun.* 70, 498-503.
- JAFFE, C.L., MCMAHON-PRATT, D., 1987. Serodiagnostic assay for visceral leishmaniasis employing monoclonal antibodies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 587-594.



- KILLICK-KENDRICK, R., MOLYNEUX, D.H., ASHFORD, R.W., 1974. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 187, 409-419.
- KILLICK-KENDRICK, R., MOLYNEUX, D.H., 1981. Transmission of leishmaniasis by the bite of phlebotomine sandflies: possible mechanisms. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 75, 152-154.
- KOUTINAS, A.F., SCOTT, D.W., KANTOS, V., LEKKAS, S., 1993. Skin lesions in canine leishmaniosis (kala azar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. Vet. Dermatol. 3, 121-130.
- KOUTINAS, A.F., POLIZOPOULOU, Z.S., SARIDOMICHELAKIS, M.N., ARGYRIADIS, D., FYTIANOU, A., PLEVRAKI, K.G., 1999. Clinical considerations on canine visceral leishmaniosis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 35, 376-383.
- KOUTINAS, A.F., SARIDOMICHELAKIS, M.N., MYLONAKIS, M.E., LEONTIDES, L., POLIZOPOULOU, Z., BILLINIS, C., ARGYRIADIS, D., DIAKOU N., PAPADOPOULOS O., 2001. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. Vet. Parasitol. 98, 247-261.
- KURKJIAN, K.M., MAHMUTOVIC, A.J., KELLAR, K.L., HAQUE, R., BERN, C., SECOR, W.E., 2006. Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. Cytometry A. 69, 353-358.
- LASRI, S., SAHIBI, H., NATAMI, A., RHALEM, A., 2003. Western blot analysis of *Leishmania infantum* antigens using sera from pentamidine-treated dogs. Vet. Immunol. Immunopathol. 91, 13-18.
- LIARTE, D.B., MENDONCA, I.L., LUZ, F.C., ABREU, E.A., MELLO, G.W., FARIAS, T.J., FERREIRA, A.F., MILLINGTON, M.A., COSTA, C.H., 2001. QBC for the diagnosis of human and canine american visceral leishmaniasis: preliminary data. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 34, 577-581.



- LIEW, F.Y., O'DONNELL, C.A., 1993. Immunology of leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 32, 161–259.
- LING, G.V., RUBY, A.L., HARROLD, D.R., JOHNSON, D.L., 1991. Xanthine-containing urinary calculi in dogs given allopurinol. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 11, 1935–1940.
- LOCKSLEY, R.M., PINGEL, S., LACY, D., WAKIL, A.E., BIX, M., FOWELL, D.J., 1999. Susceptibility to infectious diseases: *Leishmania* as a paradigm. *J. Infect. Dis.* 179, 305-308.
- LOPEZ, R., LUCENA, R., NOVALES, M., GINE, P.J., MARTIN, E., MOLLEDA, J.M., 1996. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniosis. *Zentralbl. Veterinarmed B.* 43, 469–474.
- MACRÌ, B., GALOFARO, V., MAZZULLO, G., GURNARI, M., MAZZACUVA, N., BORRELLI, G.M., 1997. Prima segnalazione in Italia di Leishmaniosi in un lupo. *Praxis*, 3: 25-28.
- MANCIANTI, F., MECIANI, N., 1988. Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counter immuno-electrophoresis. *Am. J. Vet. Res.* 49, 1409-1411.
- MANCIANTI, F., FALCONE, M.L., GIANNELLI, C., 1990. Identificazione e caratterizzazione degli agenti di isolati di *Leishmania infantum* mediante sieri di cani affetti da leishmaniosi. *Atti della Società Italia delle Scienze Veterinarie XLIV*: 1239-1242.
- MANCIANTI, F., BIZZETI, M., 2000. Terapia della leishmaniosi canina. *Obiett. Doc. Vet.*, 5, 7-17.
- MANNA, L., VITALE, F., REALE, S., CARACAPPA, S., PAVONE, L.M., DELLA MORTE, R., CRINGOLI, G., STAIANO, N., GRAVINO, A.E., 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 125, 251–262.



- MANNA, L., REALE, S., VIOLA, E., VITALE, F., FOGLIA MANZILLO, V., PAVONE, L.M., CARACAPPA, S., GRAVINO, A.E., 2006. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet. Parasitol.* 142, 271-280.
- MANETTI R., PARRONCHI P., GIUDIZI M.G., PICCINNI, M.P., MAGGI, E., TRINCHIERI, G., ROMAGNANI, S., 1993. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12] induces T helper Type 1 (Th 1)- specific immune responses and inhibits the development of IL-4 producing Th cells. *J. Exp. Med.* 177, 1199-1204.
- MAROLI, M., GRAMICCIA, M., GRADONI, L., 1987. Natural infection of *Phlebotomus perfiliewi* with *Leishmania infantum* in a cutaneous leishmaniasis focus of the Abruzzi region, Italy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 596-598.
- MAROLI, M., BIGLIOCCHI, F., KHOURY, C., 1994. Sandflies in Italy: observations on their distribution and methods for control. *Parassitologia* 36, 251-264.
- MARTÍNEZ-SUBIELA, S., TECLES, F., ECKERSALL, P.D., CERÓN, J.J., 2002. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet. Rec.* 150, 241-244.
- MIRANDA, S., MARTORELL, S., COSTA, M., FERRER, L., RAMIS, A., 2007. Characterization of circulating lymphocyte subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol. *Vet. Parasitol.* 144, 251-260.
- MOHEBALI, M., HAJJARAN, H., HAMZAVI, Y., MOBEDI, I., ARSHI, S., ZAREI, Z., AKHOUNDI, B., NAEINI, K.M., AVIZEH, R., FAKHAR, M., 2005. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. *Vet. Parasitol.* 129, 243-251.
- MOLINA, R., AMELA, C., NIETO, J., SAN-ANDRES, M., GONZALEZ, F., CASTILLO, J.A., LUCIENTES, J., ALVAR, J., 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 491-493.



- MOREIRA, E.D.Jr., MENDES de SOUZA, V.M., SREENIVASAN, M., NASCIMENTO, E.G., PONTES de CARVALHO, L., 2004. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Vet. Parasitol.* 122, 245-252.
- MORENO, J., ALVAR, J., 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 18, 399–405.
- MOSMANN, T.R., MOORE, K.W., 1991. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol. Today* 12, 49–53.
- MURRAY, H.W., DELPH-ETIENNE, S., 2000. Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in mice deficient in T cells and activated macrophage microbicidal mechanisms. *J. Infect. Dis.* 181, 795-799.
- NATALE, A., 2004. La leishmaniosi in Italia. *Obiett. Doc. Vet.* 12, 23-28.
- NOGUEIRA, F.S., MOREIRA, M.A., BORJA-CABRERA, G.P., SANTOS, F.N., MENZ, I., PARRA, L.E., XU, Z., CHU, H.J., PALATNIK-de-SOUSA, C.B., LUVIZOTTO M.C., 2005. Leishmune[®] vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine* 23, 4805-4810.
- NOLI, C., AUXILIA, S.T., 2005. Treatment of canine Old World visceral Leishmaniasis: a systematic review. *Vet. Dermatol.* 16, 213-232.
- O'GARRA, A., VIEIRA, P., 2007. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 425-428.
- OLIVA, G., GRADONI, L., CIARAMELLA, P., DE LUNA, R., CORTESE, L., ORSINI, S., DAVIDSON, R.N., PERSECHINO, A., 1995. Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 36, 1013-1019.
- OLIVA, G., GRADONI, L., CORTESE, L., ORSINI, S., CIARAMELLA, P., SCALONE, A., DE LUNA, R., PERSECHINO, A., 1998. Comparative efficacy of meglumine antimoniate and aminosidine sulphate, alone or in combination, in canine leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 92, 165-171.



- OLIVA, G., 2003. Aggiornamenti in terapia e profilassi della leishmaniosi canina. Simposio Controllo della Leishmaniosi: Veterinari e Medici a confronto. Roma 25 Maggio 2003. pp. 15-17.
- ORDEIX, L., SOLANO-GALLEGO, L., FONDEVILA, D., FERRER, L., FONDATI, A., 2005. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite specific cellular immune responses Vet. Dermatol. 16, 187–191.
- OWENS, S.D., OAKLEY, D.A., MARRYOTT, K., HATCHETT, W., WALTON, R., NOLAN, T.J., NEWTON, A., STEURER, F., SCHANTZ, P., GIGER, U., 2001. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 219, 1076-1083.
- PARADIES, P., CAPELLI, G., CAFARCHIA, C., de CAPRARIIS, D., SASANELLI, M., OTRANTO, D., 2006. Incidences of canine leishmaniasis in an endemic area of southern Italy. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health. 53, 295-298.
- PARIS, C., LOISEAU, P.M., BORIES, C., BREARD, J., 2004. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 852-859.
- PARRA, L.E., BORJA-CABRERA, G.P., SANTOS, F.N., SOUZA, L.O., PALATNIK-de-SOUSA, C.B., MENZ, I., 2007. Safety trial using the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. Vaccine 25, 2180–2186.
- PIMENTA, P.F., TURCO, S.J., MCCONVILLE, M.J., LAWYER, P.G., PERKINS, P.V., SACKS, D.L., 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. Science 256, 1812-1815.
- POLI, A., SOZZI, S., GUIDI, G., BANDINELLI, P., MANCIANTI, F., 1997. Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniasis. Vet. Parasitol. 71, 263-271.



- POLI, A., ABRAMO, F., BARSOTTI, P., LEVA, S., GRAMICCIA, M., LUDOVISI, A., MANCIANTI, F., 2002. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet. Parasitol.* 106, 181-191.
- PENNISI, M.G., DE MAJO, M., MA SUCCI, M., BRITTI, D., VITALE, F., DEL MASO, R., 2005. Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniosis with a combination of metronidazole and spiramycin. *Vet. Rec.* 156, 346-349.
- PINELLI, E., KILLICK-KENDRICK, R., WAGENAAR, J., BERNADINA, W., del REAL, G., RUITENBERG, J., 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* 62, 229-235.
- PINELLI, E., van der KAAIJ, S.Y., SLAPPENDEL, R., FRAGIO, C., RUITENBERG, E.J., BERNADINA, W., RUTTEN, V.P.M.G., 1999a. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 69, 121-126.
- PINELLI, E., GEBHARD, D., MOMMAAS, A.M., van HOEIJ, M., LANGERMANS, J.A., RUITENBERG, E.J., RUTTEN, V.P., 2000. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-Leishmanial activity. *Vet. Parasitol.* 92, 181-189.
- PRASAD, R., KUMAR, R., JAISWAL, B.P., SINGH, U.K., 2004. Miltefosine: an oral drug for visceral leishmaniasis. *Indian J. Pediatr.* 71, 143-144.
- PRÉLAUD, P., 2003. *Allergologia canina*. Prima ed. italiana (Edagricole) 7.
- PUMAROLA, M., BREVIK, L., BADIOLA, J., VARGAS, A., DOMINGO, M., FERRER, L., 1991. Canine leishmaniosis associated with systemic vasculitis in two dogs. *J. Comp. Pathol.* 105, 279-286.
- QUINNELL, R.J., COURTENAY, O., SHAW, M.A., DAY, M.J., GARCEZ, L.M., DYE, C., KAYE, P.M., 2001. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 183, 1421-1424.



- QUINNELL, R.J., COURTENAY, O., GARCEZ, L.M., KAYE, P.M., SHAW, M.A., DYE, C., DAY, M.J., 2003. IgG subclass responses in an longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 161-168.
- RANDALL, S.R., ADAMS, L.G., WHITE, M.R., DE NICOLA, D.B., 1996. Nephrotoxicity of amphotericin B administered to dogs in a fat emulsion versus five percent dextrose solution. *Am. J. Vet. Res.* 57, 1054-1058.
- REALE, S., MAXIA, L., VITALE, F., GLORIOSO, N.S., CARACAPPA, S., VESCO, G., 1999. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2931-2935.
- REIS, A.B., MARTINS-FILHO, O.A., TEIXEIRA-CARVALHO, A., CARVALHO, M.G., MAYRINK, W., FRANÇA-SILVA, J.C., GIUNCHETTI, R.C., GENARO, O., CORRÊA-OLIVEIRA, R., 2006. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* 81, 68-75.
- REITHINGER, R., QUINNELL, R.J., ALEXANDER, B., DAVIES, C.R., 2002. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2352-2356.
- RHALEM, A., SAHIBI, H., LASRI, S., JAFFE, C.L., 1999. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after drug treatment. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71, 69-76.
- RIERA, C., FISA, R., UDINA, M., GALLEGÓ, M., PORTUS, M., 2004. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 102-110.
- RIVÒ, G., POGGI, M., MIGNONE, W., MANCIANTI, F., 2000. Immunomigrazione nella diagnosi sierologica della leishmaniosi canina: prova comparativa con l'immunofluorescenza indiretta. *Veterinaria* 14, 61-64.



- ROGERS, K.A., DEKREY, G.K., MBOW, M.L., GILLESPIE, R.D., BRODSKYN, C.I., TITUS, R.G., 2002. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. FEMS Microbiol. Lett. 209, 1–7.
- ROSYPAL, A.C., TROY, G.C., ZAJAC, A.M., FRANK, G., LINDSAY, D.S., 2005a. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. J. Parasitol. 91, 970-972.
- ROSYPAL, A.C., GOGAL, R.M.Jr., ZAJAC, A.M., TROY, G.C., LINDSAY, D.S., 2005b. Flow cytometric analysis of cellular immune responses in dogs experimentally infected with a North American isolate of *Leishmania infantum*. Vet. Parasitol. 131, 45-51.
- ROURA, X., SANCHEZ, A., FERRER, L., 1999. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. Vet. Rec. 144, 262–264.
- ROURA, X., 2001. Uso della PCR nella diagnosi della leishmaniosi canina - Atti Incontro SIDEV 25.
- SACKS, D.L., PERKINS, P.V., 1984. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. Science 223, 1417-1419.
- SACKS, D., NOBEN-TRAUTH, N., 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nat. Rev. Immunol. 2, 845–858.
- SALDARRIAGA, O.A., TRAVI, B.L., PARK, W., PEREZ, L.E., MELBY, P.C., 2006. Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs. Vaccine 24, 1928-1940.
- SANTOS, M., MARCOS, R., ASSUNCAO, M., MATOS, A.J., 2006. Polyarthritis associated with visceral leishmaniasis in a juvenile dog. Vet. Parasitol. 141, 340-344.
- SANTOS-GOMES, G.M., ROSA, R., LEANDRO, C., CORTES, S., ROMAO, P., SILVEIRA, H., 2002. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. Vet. Immunol. Immunopathol. 88, 21–30.



- SCHONIAN, G., SCHWEYNOCH, C., ZLATEVA, K., OSKAM, L., KROON, N., GRASER, Y., PRESBER, W., 1996. Identification and determination of the relationships of species and strains within the genus *Leishmania* using single primers in the polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77, 19–29.
- SCHULZ, A., MELLENTIN, K., SCHONIAN, G., FLEISCHER, B., DROSTEN, C., 2003. Detection, differentiation and quantitation of pathogenic *Leishmania* organisms by a fluorescence resonance energy transfer based real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1529–1535.
- SOLANO-GALLEG0, L., MORELL, P., ARBOIX, M., ALBEROLA, J., FERRER, L., 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.* 39, 560–563.
- SPELLBERG, B., EDWARDS, J.E.Jr., 2001. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.* 32, 76–102.
- STOBIE, L., GURUNATHAN, S., PRUSSIN, C., SACKS, D.L., GLAICHENHAUS, N., WU, C.Y., SEDER, R.A., 2000. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8427–8432.
- SUNDAR, S., 2001. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health* 6, 849–854.
- SUNDAR, S., MEHTA, H., SURESH, A.V., SINGH, S.P., RAI, M., MURRAY, H.W., 2004. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. *Clin. Infect. Dis.* 38, 377–383.
- SUNDAR, S., CHATTERJEE, M., 2006. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J. Med. Res.* 123, 345–352.
- TOBIE, E.J., VON BRAND, T., MEHELMAN, B., 1950. Cultural and physiological observations on *Trypanosoma rhodiense* and *Trypanosoma gambiense*. *J. Parasitol.* 36, 48–54.



- TRAVI, B.L., TABARES, C.J., CADENA, H., FERRO C., OSORIO, Y., 2001. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64, 119–124.
- TURCO, S.J., DESCOTEAUX, A., 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 65-94.
- TURREL, J.M., POOL, R.R., 1982. Bone lesions in four dogs with visceral leishmaniasis. *Vet. Radiol.* 23, 243–249.
- UZONNA, J.E., WEI, G., YURKOWSKI, D., BRETSCHER, P., 2001. Immune elimination of *Leishmania major* in mice: implications for immune memory, vaccination, and reactivation disease. *J. Immunol.* 167, 6967-6974.
- VALLADARES, J.E., RUIZ DE GOPEGUI, R., RIERA, C., ALBERALA, J., GALLEGO, M., ESPADA, Y., PORTUS, M., ARBOIS, M., 1998. Study of haemostatic disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs. *Res. Vet. Sci.* 64, 195–198.
- VEXENAT, J.A., OLLIARO, P.L., FONSECA DE CASTRO, J.A., CAVALCANTE, R., FURTADO CAMPOS, J.H., TAVARES, J.P., MILES, M.A., 1998. Clinical recovery and limited cure in canine visceral leishmaniasis treated with aminosidina (paromomycin). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 448–453.
- VITALE, F., REALE, S., VITALE, M., PETROTTA, E., TORINA, A., CARACAPPA, S., 2004. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1026, 139–143.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001. WHO information by topics or disease: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>.